



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTOS DE CALRETICULINA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN
LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS *IN VIVO* EN RATAS
DIABÉTICAS**

Javiera Andrea Parra Corvalán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: Dr. JOSÉ IGNACIO ARIAS FERNÁNDEZ
Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 11130257

SANTIAGO, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTOS DE CALRETICULINA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN
LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS *IN VIVO* EN RATAS
DIABÉTICAS**

Javiera Andrea Parra Corvalán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Clínicas

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA: JOSÉ IGNACIO ARIAS F.
PROFESOR CORRECTOR: SOLEDAD FERNÁNDEZ G.
PROFESOR CORRECTOR: SONIA ANTICEVIC C.

SANTIAGO, CHILE
2019

RESUMEN

Una de las principales consecuencias producidas por la diabetes mellitus en personas, es el desarrollo de heridas crónicas. Hoy en día, constituyen un problema de salud pública, debido a que son cada vez más frecuentes y se asocian con altos costos de tratamiento, por lo que se han estudiado diversos agentes terapéuticos. La Calreticulina (CRT) es una proteína chaperona y ligadora de calcio del retículo endoplásmico, ampliamente distribuida en las células eucariotas que se expresa en las células de diferentes mamíferos. Esta proteína, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, ha demostrado tener un importante rol en la cicatrización de heridas cutáneas y diversos procesos asociados con la reparación cutánea, mejorando la migración y proliferación celular. La aplicación tópica de CRT produjo un marcado aumento de la tasa y calidad de la cicatrización de heridas en modelos experimentales en porcinos, y una disminución significativa en el tiempo para completar el cierre de heridas en ratones genéticamente diabéticos tratados con CRT humana y de conejo. Por otro lado, la calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT), además de ser altamente homóloga a su contraparte humana, ha demostrado ser más eficiente que la calreticulina de humano en la aceleración de la cicatrización de heridas. Sin embargo, no hay información con respecto a la aplicación tópica de TcCRT en heridas de pacientes diabéticos. El objetivo principal de esta memoria de título fue analizar el efecto de la proteína TcCRT en dos concentraciones diferentes en la cicatrización de heridas *in vivo* en ratas diabéticas. Una concentración baja de 2.5 ng/μl fue más efectiva estimulando el proceso de reepitelización, la formación de tejido de granulación y la maduración de la dermis. Estos resultados reafirman el efecto de TcCRT sobre la cicatrización en un modelo experimental realizado en ratas diabéticas, augurando su potencial uso como agente terapéutico tópico en el tratamiento de heridas crónicas.

Palabras clave: Diabetes mellitus, heridas crónicas, calreticulina, reepitelización, tejido de granulación, maduración de la dermis.

ABSTRACT

One of the main consequences produced by diabetes mellitus in people is the development of chronic wounds. Nowadays, they constitute a public health problem, because they are increasingly frequent and are associated with high cost of treatment, thus several therapeutic alternatives have been studied. Calreticulin (CRT) is a calcium-binding, chaperone protein of the endoplasmic reticulum, widely distributed in eukaryotic cells, and expressed in the cells of different mammals. This protein has shown to play an important role in healing of cutaneous wounds and diverse processes associated with skin repair through *in vivo* and *in vitro* studies, improving cell migration and proliferation. The topical application of CRT produced a marked increase in the rate and quality of wound healing in pig experimental models, and a significant decrease in time to complete the closure of wounds in genetically diabetic mice treated with human and rabbit CRT. On the other hand, *Trypanosoma cruzi calreticulin* (TcCRT), in addition to being highly homologous to its human counterpart, has shown to be more efficient than human calreticulin in accelerating wound healing. However, there is no information regarding the topical application of TcCRT in diabetic wounds. The main aim of this research was to analyze the effect of the TcCRT protein in two different concentrations on the *in vivo* wound healing process in diabetic rats. A low concentration of 2.5 ng/ μ l was more effective in stimulating the reepithelialization process, the granulation tissue formation and the dermis maturation. These results reaffirm the effect of TcCRT on the healing process in an experimental model performed in diabetic rats, auguring its potential use as a topical therapeutic agent in the treatment of chronic wounds.

Key words: Diabetes mellitus, chronic wounds, calreticulin, reepithelialization, granulation tissue, maturation dermis.

INTRODUCCIÓN

La piel es una estructura dinámica y compleja, compuesta por una diversidad de poblaciones celulares, matriz extracelular, anexos cutáneos y estructuras vasculares y nerviosas. Ésta comprende principalmente a la epidermis y la dermis, y sus funciones más relevantes son; actuar como barrera contra los peligros ambientales y microorganismos, prevenir la deshidratación, regular la temperatura corporal y posee la capacidad de auto-reparación (Honari y Maibach, 2014).

La cicatrización de las heridas es un proceso fisiológico de gran complejidad que tiene la finalidad de restaurar la integridad de la piel y evitar así, cualquier anomalía en su función como barrera (Bielsa, 2006). Sin embargo, en pacientes diabéticos la cicatrización se ve alterada, generando heridas crónicas resistentes a los tratamientos y que se infectan persistentemente (Greives *et al.*, 2012). Por lo tanto, hoy en día son un gran desafío para los profesionales de la salud, ya que consumen una gran cantidad de recursos médicos y económicos (Frykberg y Banks, 2015).

Actualmente existen varias opciones de agentes terapéuticos para el tratamiento de heridas crónicas, dentro de los cuales se encuentran los factores de crecimiento y las células madres. Sin embargo, la mayoría de estos productos no tienen evidencia de alto nivel científico, para comprobar su eficacia (Frykberg y Banks, 2015).

Una alternativa al uso de los agentes terapéuticos disponibles actualmente para mejorar la cicatrización en heridas crónicas es la Calreticulina (CRT). Ésta es una proteína chaperona del retículo endoplásmico, ampliamente distribuida en células eucariontes (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018). Varios estudios han analizado el efecto de la CRT exógena en la reparación cutánea, demostrando que la aplicación tópica de CRT humana recombinante (HuCRT) en modelos experimentales *in vivo* en ratas genéticamente diabéticas produce un marcado aumento de la velocidad y calidad de cicatrización (Greives *et al.*, 2012). Esta proteína también se encuentra presente en el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, siendo denominada TcCRT, y es altamente homóloga a la CRT humana (HuCRT) (Ferreira *et al.*, 2004). Estudios recientes han demostrado que la TcCRT recombinante, es más eficiente que la HuCRT recombinante acelerando la cicatrización de heridas *in vivo* en ratas sanas, y

aumentando la migración y proliferación de fibroblastos humanos *in vitro* (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018), por lo que se requiere una menor cantidad de ésta para lograr el mismo efecto. Sin embargo, no hay información con respecto al uso de TcCRT en heridas crónicas de pacientes diabéticos.

Por esta razón, esta memoria de título analizó y comparó el efecto de dos concentraciones diferentes de TcCRT en la cicatrización de heridas *in vivo* en ratas diabéticas; con el fin de desarrollar terapias más eficientes en el tratamiento de heridas crónicas en pacientes diabéticos en el futuro.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y tiene múltiples características fundamentales para interactuar dinámicamente con el medio ambiente. Es una estructura diversa y compleja compuesta por diferentes poblaciones celulares, matriz extracelular, anexos cutáneos y estructuras vasculares y nerviosas. Las principales funciones de la piel incluyen; actuar como barrera contra los peligros ambientales como la radiación ultravioleta, agresiones físicas o químicas y microorganismos, también previene la deshidratación, regula la temperatura, y cumple funciones de auto-reparación. La piel comprende principalmente la epidermis, que actúa como barrera, y la dermis, que contiene la red vascular, linfática y nerviosa (Honari y Maibach, 2014).

La epidermis, un epitelio poliestratificado cornificado, es la capa más externa de la piel y está compuesta principalmente por tres tipos de células, los queratinocitos, los melanocitos y las células de Langerhans. Los queratinocitos son las células predominantes en la epidermis, que se generan constantemente en el estrato basal y pasan a través de un proceso de maduración, diferenciación, y migración hacia la superficie. A medida que los queratinocitos se diferencian, forman tres capas por encima de la capa basal, conocidas como: estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo (Honari y Maibach, 2014).

La dermis se encuentra por debajo de la membrana basal de la epidermis y está formada por células, fibras colágenas y elásticas y matriz extracelular amorfa que conforman un tejido conjuntivo denso irregular que se extiende hasta la hipodermis. Los tipos de células que residen en la dermis incluyen fibroblastos, macrófagos, mastocitos, células mesenquimáticas y células inmunes circulantes. La dermis es responsable de la elasticidad de la piel, flexibilidad y resistencia a la tracción y proporciona protección contra daños mecánicos, retiene agua, y ayuda en la regulación térmica. Asimismo, contiene estructuras nerviosas y vasculares, siendo un elemento clave en la cicatrización de heridas (Honari y Maibach, 2014).

Diabetes

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por la presencia de

hiperglucemia debido a una secreción insuficiente de insulina, acción defectuosa de la insulina o ambas. La hiperglucemia crónica de diabetes se asocia con complicaciones microvasculares a largo plazo que afectan a los ojos, riñones y nervios (Goldenberg y Punthakee, 2013).

Proceso normal de cicatrización de la herida

La cicatrización de las heridas es una secuencia compleja de fenómenos celulares y bioquímicos dirigidos a restablecer la integridad tisular después de la lesión. El proceso normal de cicatrización de las heridas implica cuatro fases distintas pero superpuestas: hemostasia, inflamación, proliferación (formación del tejido de granulación), y maduración (Demidova-Rice *et al.*, 2012). Cada una de estas fases está controlada por sustancias biológicamente activas denominadas factores de crecimiento, que controlan el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo de las células (Conway y Harding, 2008).

Durante la fase de hemostasia, la coagulación de la sangre previene el sangrado excesivo y proporciona una protección provisional de la zona de la herida. Durante la fase inflamatoria se produce el reclutamiento de leucocitos, neutrófilos y macrófagos, la producción de factores de crecimiento y la activación de las células dérmicas y epidérmicas (Demidova-Rice *et al.*, 2012). Posteriormente, en la fase proliferativa habrá migración y proliferación de fibroblastos hacia la herida, los cuales son los encargados de sintetizar la matriz extracelular rica en colágeno para el desarrollo del tejido de granulación (Greives *et al.*, 2012) y además se inicia una respuesta angiogénica que permite la vascularización del tejido de granulación, mientras se desarrolla el proceso de reepitelización. Por último, durante la fase de maduración ocurre la remodelación de la matriz extracelular y la apoptosis celular, que conduce a la formación de una cicatriz relativamente acelular con propiedades físicas que son compatibles con la piel normal (Demidova-Rice *et al.*, 2012). A pesar de que la fase de remodelado dura hasta un año, las fibras de colágeno en el tejido de la cicatriz nunca vuelven a ser tan organizadas como las de la dermis intacta (Bielsa, 2006).

Efecto de la diabetes sobre la cicatrización de la herida

Se ha demostrado que la diabetes influye sobre muchas de las respuestas habituales de la cicatrización de las heridas. De esta manera un traumatismo en la piel de una persona

diabética da lugar a una herida aguda, que puede progresar a una herida crónica que es difícil de cicatrizar o lo hace lentamente (Conway y Harding, 2008). Las heridas crónicas se definen como heridas que no avanzan a través de las fases normales de cicatrización de manera ordenada y en los tiempos adecuados debido a deficiencias moleculares y celulares (Frykberg y Banks, 2015). En pacientes diabéticos esto se debe principalmente a la falta de señales celulares. La cantidad de factores de crecimiento se ve afectada debido a la constante afluencia de células inflamatorias que liberan enzimas citotóxicas y otros mediadores inflamatorios que producen la degradación e inactivación de los factores de crecimiento presentes, necesarios para una correcta función celular. Además, las células derivadas de la epidermis y la dermis que residen en las heridas crónicas presentan anomalías fenotípicas que incluyen una menor densidad de receptores de factores de crecimiento, un menor potencial mitogénico y una menor capacidad de la célula de para migrar que les impide responder adecuadamente a las señales ambientales. Por lo tanto, se ve interrumpida la migración y proliferación celular, además de una disminución en la formación del tejido de granulación, lo cual dificulta el proceso de reepitelización en el cierre de la herida. Consecuentemente, estas heridas se caracterizan por estar detenidas en la fase inflamatoria y presentan infecciones persistentes, que contribuyen a la cronicidad de la herida (Demidova-Rice *et al.*, 2012).

Calreticulina

La Calreticulina (CRT) es una proteína chaperona de unión de calcio del retículo endoplásmico, que funciona dirigiendo el adecuado plegamiento de las proteínas y controlando muchas funciones celulares a través del control homeostático de los niveles de calcio del citosol y del retículo endoplásmico (Greives *et al.*, 2012). La CRT está ampliamente distribuida en las células eucariotas y se expresa en las células de diferentes mamíferos (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018).

Actualmente, se sabe que la CRT también puede regular una variedad de procesos biológicos desde la superficie celular y el espacio extracelular (Greives *et al.*, 2012). Sus funciones extracelulares se han analizado en varios estudios *in vitro* e *in vivo*, donde se ha demostrado que la CRT tiene un importante rol en la cicatrización de heridas y diversos procesos asociados con la reparación cutánea, como la inhibición de la angiogénesis, promoción de la

adhesión celular y también posee un efecto antitumoral (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha demostrado que la aplicación tópica de CRT produce un marcado aumento de la tasa y calidad de la cicatrización de heridas en modelos experimentales porcinos. Por otro lado, en ratones genéticamente diabéticos tratados con CRT humana y de conejo, ésta induce una disminución significativa en el tiempo para completar el cierre de heridas en comparación con las heridas no tratadas, aumenta la velocidad de reepitelización, promueve la migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos y aumenta la cantidad de tejido de granulación. Estos estudios otorgan a la CRT un gran potencial como agente terapéutico tópico para el tratamiento de las heridas en pacientes diabéticos y otras heridas crónicas (Greives *et al.*, 2012).

Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario flagelado responsable de la enfermedad de Chagas. A diferencia de otros tripanosomas, *T. cruzi* cicla entre estadios extracelular e intracelular. Una de las moléculas involucradas en la interacción huésped-parásito es la CRT de *T. cruzi* (TcCRT). Esta proteína se ha encontrado en el retículo endoplásmico, en la superficie de la membrana y fuera del parásito (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018).

La TcCRT es un 50% homóloga a la CRT humana (HuCRT) y comparten varias funciones. Sin embargo, la TcCRT es tres veces más eficiente en términos molares que la HuCRT aumentando la proliferación y migración de fibroblastos humanos *in vitro*, y tiene un mayor efecto antiangiogénico y antitumoral. Estos efectos diferenciales observados *in vitro* se correlacionan con los obtenidos *in vivo*. Por lo tanto, TcCRT es más efectiva que la HuCRT acelerando la cicatrización de heridas (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en esta memoria de título se analizó el efecto de la proteína TcCRT, en dos concentraciones diferentes, en la cicatrización de heridas *in vivo* en ratas diabéticas, permitiendo identificar la concentración de TcCRT más eficiente para mejorar su cicatrización. Esto permitirá acercarse a la creación de medicamentos que sean más eficientes para el tratamiento de heridas crónicas en pacientes diabéticos (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018).

HIPÓTESIS

La aplicación de la proteína TcCRT mejora la cicatrización de heridas cutáneas crónicas en ratas diabéticas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la aplicación de TcCRT en la cicatrización de heridas *in vivo* en ratas diabéticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la condición de rata diabética.
2. Determinar y comparar el efecto de concentraciones altas y bajas de TcCRT, en la reepitelización de epidermis, en la formación de tejido de granulación y en la maduración de la dermis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa (BiMre), del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile y formaron parte del Proyecto FONDECYT 11130257 a cargo del Dr. José Ignacio Arias Fernández.

1. Obtención de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*

Se trabajó con moléculas recombinantes de TcCRT sintetizadas y entregadas por el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM) dirigido por el Dr. Arturo Ferreira (Instituto de Cs. Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

2. Ensayo *in vivo* en heridas en piel de ratas diabéticas

Todos los protocolos realizados con animales para este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética y el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 1) y por el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT (Anexo 2).

Para esta memoria, se indujo diabetes mellitus a nueve ratas macho adultas, de raza Sprague-Dawley, de un peso entre 400 a 450 g, basándose en el modelo estandarizado de diabetes experimental de Vélez *et al.*, (2015), con una única inyección intraperitoneal de 55 mg/kg de estreptozotocina (Sigma[®]) disuelta en solución salina balanceada de Hank (HBSS) 1X (HyClone[™]) y esterilizada con filtros de jeringa Minisart[®] PES de 0,2 µm. Luego de 48 horas de la administración de estreptozotocina, las ratas fueron sometidas a pruebas de glucosa en sangre, utilizando un medidor de glucosa (Accu-Chek[®] Advantage). Aquellas con niveles sostenidos de glucemia mayores a 200 mg/dL a las 48 horas y a los seis días posteriores a esa medición fueron consideradas diabéticas.

Después de confirmar la glicemia a los seis días, las ratas fueron sometidas a una cirugía. Para ello se anestesiaron inhalatoriamente con isoflurano al 2%, utilizando una cámara anestésica para la inducción y una mascarilla facial para la mantención. Previo a la realización de las heridas, la piel de la zona dorsal de las ratas fue afeitada y luego desinfectada con alcohol yodado. Posteriormente, mediante el uso de un “punch” de biopsia

escisional Kruuse[®], de un diámetro de 6 mm, se realizaron tres heridas del espesor total de la piel en la zona dorsal retroescapular. Para evitar la contracción de la herida producida por el músculo panicular que está situado inmediatamente debajo de la dermis, se utilizaron capitones circulares plásticos con un diámetro interno de 6 mm (tamaño de la herida), los cuales se alinearon alrededor de la herida fijando los bordes de ésta, exponiendo así la herida en su centro, permitiendo proporcionar un modelo más adecuado para simular la curación de heridas cutáneas en humanos (Figura 1).

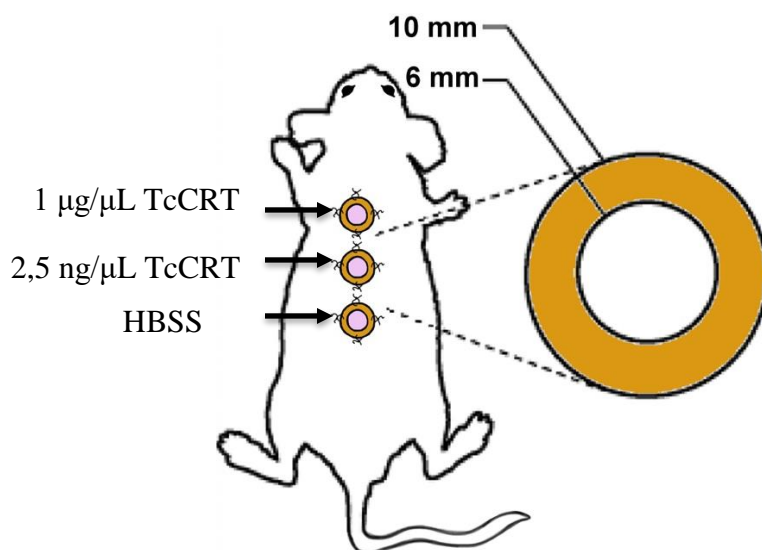


Figura 1. Distribución de heridas experimentales en ratas *in vivo*. Tres heridas de 6mm del grosor total de la piel se realizaron en la zona dorsal retroescapular en cada rata. Se aplicaron 10 µL de TcCRT a una concentración alta (1 µg/µL) en la primera herida y a una concentración baja (2,5 ng/µL) en la segunda herida y la tercera herida solo se le aplicó HBSS.

Luego, se dejó que las heridas cicatricen por segunda intención durante 5, 10 y 30 días. Para esto se hicieron tres grupos de tres ratas cada uno. Durante este periodo se aplicó una dosis tópica de 10 µL de TcCRT día por medio en cada herida. En la primera herida a una concentración alta de 1 µg/µL, la segunda, una concentración baja de 2,5 ng/µL, y la tercera herida actuó como control negativo colocándole sólo HBSS (Figura 1). Los animales fueron provistos con comida y agua *ad libitum* durante toda la duración del experimento, y alojados en jaulas individuales, en un ambiente controlado a temperatura de 24° C y humedad constante de 45%.

Una vez finalizados los correspondientes períodos experimentales, las ratas fueron sacrificadas en una cámara de inducción anestésica mediante sobredosis de isoflurano. Inmediatamente, se retiraron las heridas con un margen adyacente de la piel normal. El tejido fue fijado en Glyo-Fixx™ y fue cortado en secciones de tejido de 5,0 μm de grosor, las cuales fueron montados en portaobjetos de vidrio y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Por último, se seleccionaron cuatro cortes histológicos por cada herida experimental para su posterior análisis histológico, el cual fue realizado por dos académicos, de los cuales uno de ellos desconocía el tratamiento recibido por cada herida. Los cadáveres de los animales fueron incinerados para su descarte.

3. Análisis histológico de reepitelización

El grado de reepitelización de las heridas se determinó mediante la medición combinada de la epidermis recién formada sobre la herida por migración desde los bordes de ésta y las islas epiteliales derivadas del epitelio sobreviviente de los folículos pilosos. Estas medidas de reepitelización se presentaron como un porcentaje de la longitud total de la herida. Las digitalizaciones de las imágenes del tejido se realizaron con un microscopio Motic AE31 provisto de una cámara Moticom Pro 282A y un “software” de digitalización Motic Images Plus v 2.0.

4. Evaluación de la formación de tejido granulación y profundidad de la neodermis

El tejido de granulación está formado en gran parte por la neodermis y ocurre luego que el proceso de reepitelización epidérmica está casi completo. La profundidad de la neodermis se midió desde la unión dermo-epidérmica hasta la intersección del tejido de granulación recién formado con el músculo panicular subyacente. Los resultados fueron expresados en milímetros y comparados con el promedio de la profundidad de la dermis de una rata normal (aprox. 1,50 mm).

5. Evaluación de la densidad celular de la dermis

La madurez de la dermis se ve reflejada por un tejido conectivo denso que contiene fibras de colágeno y elastina entrecruzadas, y una menor celularidad, es decir, menos fibroblastos, macrófagos y adipocitos. El número de células presentes entre las fibras de colágeno fue

determinado mediante el conteo de células/mm². Los resultados fueron comparados con el promedio de células en dermis de una rata normal (aprox. 96.000 células/ mm²).

6. Evaluación del perímetro de las heridas

Se tomaron fotografías digitales de las heridas a los 5, 10 y 30 días después de la cirugía. Se trazó el margen de las heridas en la fotografía digital con un mouse de computadora de resolución fina y se determinó el área de cada herida usando el programa NIH ImageJ.

7. Diseño estadístico

Los datos obtenidos en el análisis histológico fueron analizados mediante el programa InfoStat[®] y se aplicaron análisis de varianza y pruebas de comparación *a posteriori*.

Los datos obtenidos en el análisis histológico de los cortes histológicos de las heridas para la evaluación del proceso de reepitelización, formación de tejido de granulación y maduración de la neodermis fueron recolectados con el programa Excel. Luego se utilizó el programa Infostat[®] para realizar los análisis estadísticos. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilks para saber qué tipo de distribución tenían los datos, los cuales presentaron una distribución no paramétrica, por lo que se aplicó análisis de varianza y prueba de comparación de Kruskal-Wallis, para análisis de datos no paramétricos, para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

RESULTADOS

1. Análisis histológico de reepitelización

En la Figura 2 se observan los porcentajes promedios de reepitelización de las heridas según tratamiento recibido en cada periodo experimental, a los cinco, diez y treinta días de cicatrización por segunda intención, en donde se observa que el máximo efecto sobre el proceso de reepitelización fue obtenido con 2,5 ng/μL de TcCRT, logrando un 100% de reepitelización al día 30 de tratamiento, mientras que los controles negativos (que no recibieron tratamiento) muestran los porcentajes más bajos de reepitelización. Después de cinco días de cicatrización se observó un porcentaje significativamente bajo de

reepitelización de un 4,9% en las heridas control. Después de diez días las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT alcanzaron un porcentaje de cierre de la herida de un 53,6%, mientras que las heridas no tratadas y tratadas con una concentración alta de TcCRT presentaron un porcentaje de reepitelización de 14,3% y 32,3% respectivamente. A los treinta días solo las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT alcanzaron un cierre completo de la herida (100% de reepitelización). Por lo tanto, el tratamiento con una concentración baja de TcCRT (2,5 ng/μL) fue más efectivo que el tratamiento con una concentración alta de la proteína (1 μg/μL) para aumentar el porcentaje de reepitelización.

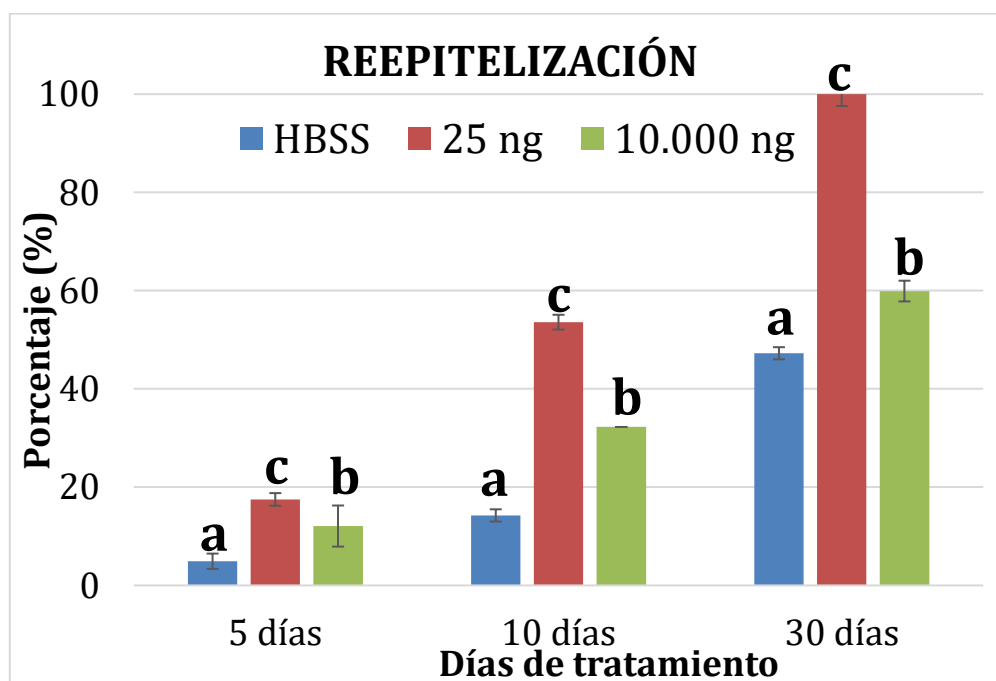


Figura 2. Porcentaje de reepitelización de las heridas según tratamiento recibido. Cada tratamiento por cada periodo experimental tiene una letra diferente por lo que son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

2. Evaluación de la formación de tejido granulación y profundidad de la neodermis

En la Figura 3 se muestra la profundidad de la neodermis de las heridas según tratamiento recibido en cada periodo experimental, en donde se observa que el mayor efecto sobre la formación de tejido de granulación fue obtenido con 2,5 ng/μL de TcCRT, mientras que los resultados de formación de tejido de granulación de los controles negativos (que no

recibieron tratamiento) y el tratamiento con concentraciones altas de TcCRT (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) no son significativamente diferentes y muestran una menor formación de tejido de granulación. A los 5 días de cicatrización, las heridas no tratadas y las tratadas con una concentración alta de TcCRT no mostraron diferencias significativas y solo alcanzaron un 14% de la profundidad normal de la neodermis (0,21-0,22 mm). Por otro lado, las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT alcanzaron una altura de la neodermis dos veces mayor con 0,40 mm, 27% de la profundidad normal. Luego, a los diez días de cicatrización, las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT alcanzaron un 71% de la profundidad normal de la neodermis (1,07 mm), mientras que las heridas control y las tratadas con una concentración alta de TcCRT mostraron una baja formación de tejido de granulación alcanzando un 31% (0,47 mm) y un 26% (0,39 mm) de la profundidad normal respectivamente. A los 30 días de cicatrización, la neodermis de las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT lograron alcanzar un 90% de la normalidad (1,35 mm), por el contrario, las heridas control y las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT no mostraron diferencias significativas, alcanzando solo un 63% de la profundidad normal de neodermis (0,95 mm).

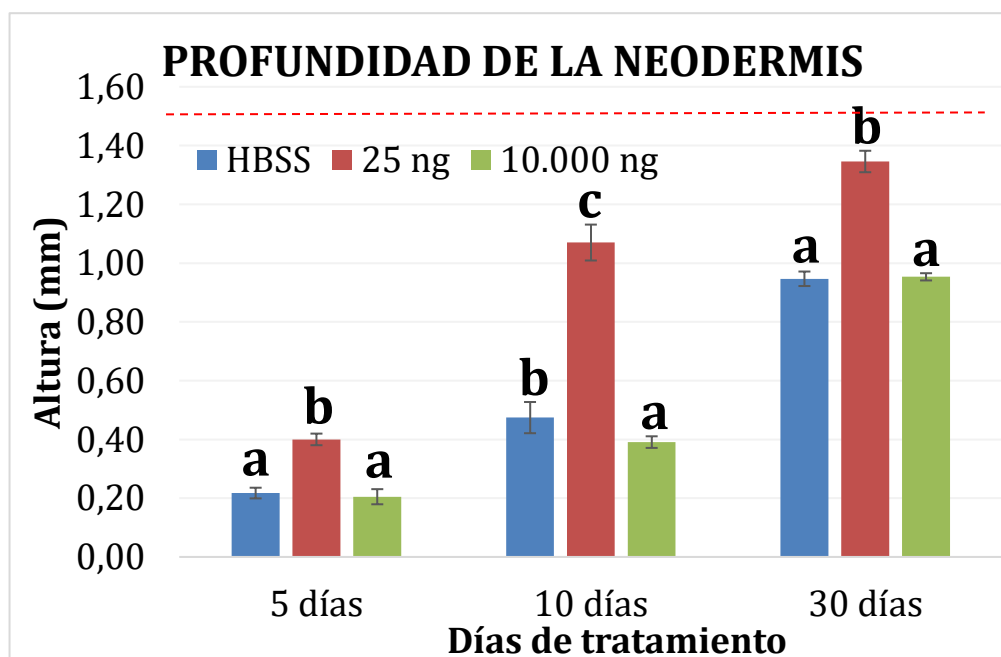


Figura 3. Profundidad de la neodermis de las heridas según tratamiento recibido comparado con la profundidad normal de la dermis de la piel de una

rata normal, aproximadamente 1,50 mm (línea punteada roja). Los tratamientos en cada periodo experimental que poseen una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3. Evaluación de la densidad celular de la dermis

Para evaluar la maduración de la dermis se determinó la densidad celular, para esto se realizó el conteo de células por mm^2 . La Figura 4 presenta la densidad de la dermis de las heridas según el tratamiento recibido a los cinco, diez y treinta días de cicatrización comparado con el promedio de células en dermis de una rata normal (aprox. 96000 células/ mm^2). En la gráfica se puede observar que a los 5 y 10 días cicatrización las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT mostraron una celularidad significativamente mayor a las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT y las heridas control. Sin embargo, al día 30 de cicatrización las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT presentaron una celularidad significativamente menor. Después de 5 días de cicatrización, las heridas que recibieron como tratamiento una concentración baja de TcCRT presentaron una celularidad dos veces superior a la dermis normal, mientras que las heridas control y las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT presentaron una menor celularidad. A los 10 días de cicatrización, las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT presentaron una densidad celular de la dermis tres veces superior a la dermis normal, mientras que las heridas no tratadas y las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT exhibieron una celularidad dos veces más alta a la de la dermis normal. Sin embargo, a los 30 días de cicatrización las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT presentaron una menor densidad celular que tiende a la normalidad, comparado con las heridas control y las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT, las cuales presentaron una celularidad dos veces superior a la dermis de una rata normal y no presentaron diferencias significativas entre ellas. Por lo tanto, después de 30 días de cicatrización el tratamiento con una concentración baja de TcCRT (2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) fue más efectivo alcanzando una mayor madurez de la dermis comparado con el tratamiento con una concentración alta.

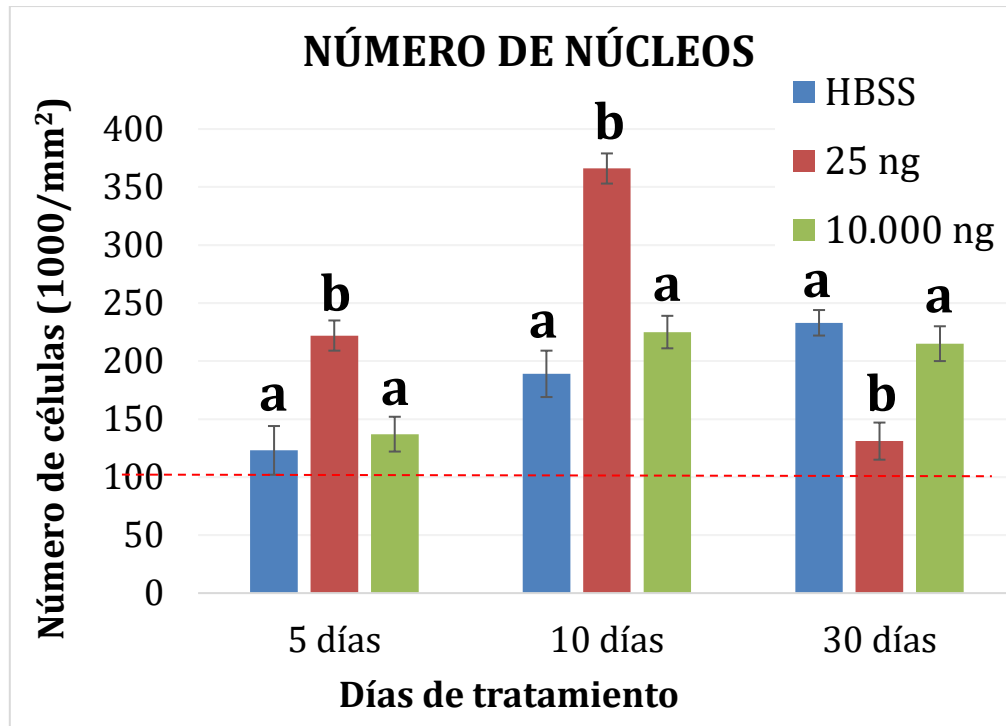


Figura 4. Densidad celular en dermis de heridas según tratamiento recibido comparado con el promedio de células en dermis de la piel de una rata normal aproximadamente 96.000 células/mm² (línea punteada roja). Los tratamientos en cada tiempo experimental que poseen la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4. Evaluación del perímetro de las heridas

La Figura 5 muestra cómo cambia el perímetro de las heridas a medida que pasa el tiempo según el tratamiento recibido, en el gráfico se puede observar que los mejores resultados fueron obtenidos con el tratamiento con una concentración baja de 2,5 ng/μL de TcCRT. Entre el día que se produce la herida (T0) y el día cinco de cicatrización (T5) no hay diferencias significativas entre los tratamientos y las heridas control. Sin embargo, a los diez días (T10) y treinta días (T30) el mayor afecto a nivel macroscópico sobre la cicatrización de las heridas se observó con el tratamiento con una baja concentración de 2,5 ng/μL de TcCRT, donde hubo una mayor disminución en el perímetro de las heridas, alcanzando un perímetro de solo 3mm². Lo cual se puede evidenciar macroscópicamente mediante las imágenes de las heridas a los distintos tiempos en la Figura 6.

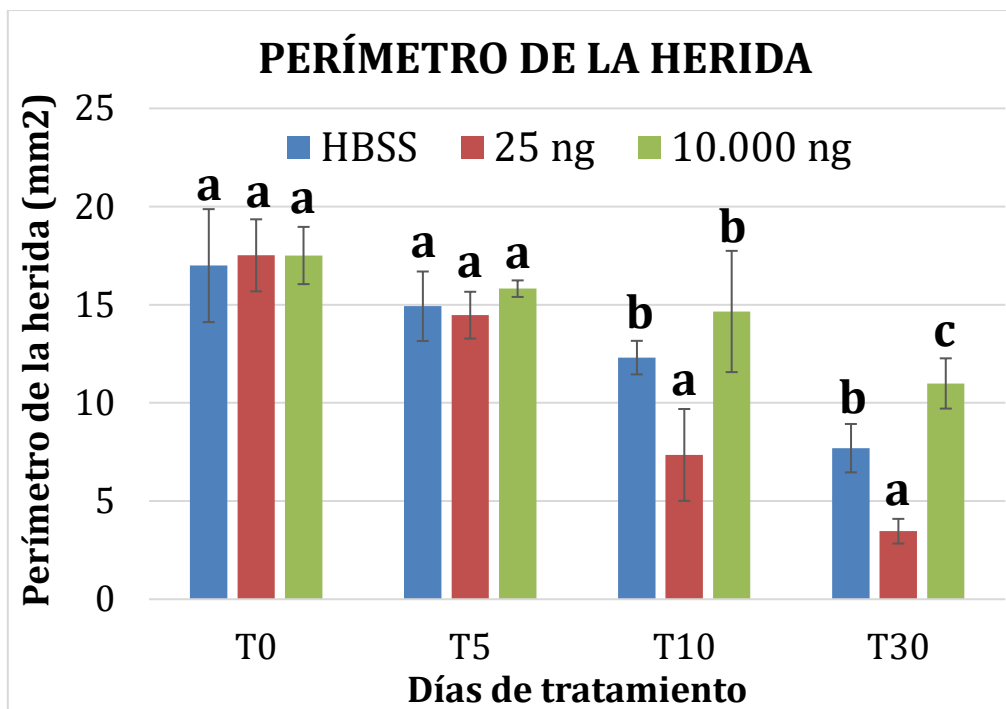


Figura 5. Perímetro de las heridas según tratamiento recibido. Los tratamientos en cada tiempo experimental que poseen la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

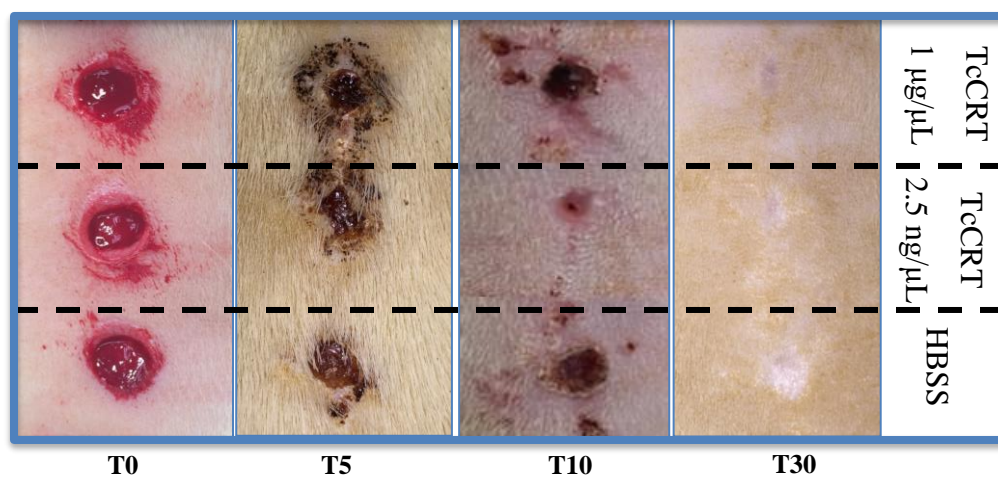


Figura 6. Imágenes de las heridas desde el primer día en que se realizó herida (T0) hasta el día 30 de cicatrización (T30) tomadas a diferentes ratas. Se muestran desde arriba hacia abajo las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT (1 µg/µL), las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT (2.5 ng/µL) y las heridas control tratadas solo con HBSS.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Uno de los factores que comprometen la buena y correcta reparación de la piel son las heridas crónicas, a consecuencia de por ejemplo enfermedades metabólicas. Las cuales, en su mayoría, se originan a partir de lesiones traumáticas menores, que en pacientes con patologías subyacentes resulta en el fracaso de la cicatrización, como ocurre en los pacientes diabéticos. Hoy en día, constituyen un problema de salud pública, debido a que son cada vez más frecuentes y se asocian con altos costos de tratamiento (Demidova-Rice *et al.*, 2012). En consecuencia, esto ha llevado al estudio de nuevos agentes terapéuticos para mejorar la cicatrización de heridas cutáneas, dentro de los cuales, podemos destacar la proteína CRT derivada de humano, conejo (Nanney *et al.*, 2008; Greives *et al.*, 2012) u organismos más primitivos como lo es el protozoo flagelado *Trypanozoma cruzi* (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018). Esta proteína ha sido analizada mediante modelos *in vitro* e *in vivo*, observándose que CRT estimula la proliferación y migración celular de queratinocitos y fibroblastos. Estas funciones se ven afectadas en las heridas crónicas de pacientes diabéticos, ambas fundamentales para una correcta cicatrización, lo cual determina una falla en la cicatrización (Nanney *et al.*, 2008; Greives *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018). Sin embargo, aún se desconoce el efecto de TcCRT en heridas crónicas.

Los resultados de esta tesis demuestran que la aplicación tópica de TcCRT en heridas crónicas acelera el proceso de reepitelización. La reepitelización, es el proceso de generación de una nueva epidermis después de una lesión, reestableciendo su función como barrera. Ésta se lleva a cabo mediante la migración y proliferación de los queratinocitos del tejido existente desde los bordes de la herida (Greives *et al.*, 2012). Se sabe que las heridas crónicas en pacientes diabéticos representan una falla para lograr una reepitelización completa en la secuencia temporal apropiada de reparación tisular (Frykberg y Banks, 2015). Por esta razón, una tasa mayor de reepitelización de la herida es uno de los mejores indicadores de una mejor cicatrización en una herida crónica (Nanney *et al.*, 2008). En este estudio, se pudo observar el efecto de TcCRT sobre la reparación cutánea desde los cinco días de efectuada la lesión, donde el tratamiento con una concentración baja de TcCRT (2,5 ng/μL) fue más efectivo aumentando el porcentaje de reepitelización al compararlo con el tratamiento con una concentración 400 veces mayor de la proteína (1 μg/μL). Mientras que, en las heridas control

se observó un porcentaje significativamente bajo de reepitelización. A los treinta días solo las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT alcanzaron un cierre completo de la herida (100% de reepitelización). Por lo tanto, se observa un mayor efecto sobre el proceso de reepitelización a una concentración baja de TcCRT. Al contrario, para lograr el mismo efecto sobre el proceso de reepitelización mediante la aplicación tópica de HuCRT en ratas diabéticas, se necesitaron 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de HuCRT (Greives *et al.*, 2012), dosis 2000 veces superior a la dosis baja de TcCRT utilizada en este estudio, observándose una mayor reepitelización del tejido desde el tercer día en heridas tratadas con HuCRT comparado con las heridas tratadas con buffer, y logrando una reepitelización completa el día veintiocho (Greives *et al.*, 2012). Por lo tanto, se demuestra que TcCRT es más eficiente que HuCRT mejorando el proceso de reepitelización de heridas de ratas diabéticas, lo cual, concuerda con los resultados obtenidos en ratas normales, no diabéticas, donde se observa que la aplicación de concentración baja de TcCRT de 2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ estimuló una mayor reepitelización de heridas, mientras que la misma concentración de HuCRT no estimuló el proceso de reepitelización (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018).

Por otro lado, cabe destacar que, pese a que la aplicación tópica de TcCRT acelera el proceso de reepitelización en heridas cutáneas de ratas diabéticas, no lo logra finalizar en los tiempos que corresponden a la piel de una rata normal bajo la influencia de TcCRT. Esto es, después de diez días de cicatrización en ratas normales el proceso de reepitelización está completamente terminado (Arias *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2018). Por el contrario, en este estudio solo se logró un 100% de reepitelización de la herida en ratas diabéticas con el tratamiento con una concentración baja de TcCRT (2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) el día treinta. Por lo cual, se puede concluir que la aplicación tópica de TcCRT acelera el proceso de reepitelización, sin embargo, no logra generar una nueva epidermis en los tiempos que corresponden a la piel de una rata normal.

Por otra parte, uno de los factores que se busca mejorar con tratamientos en las heridas de pacientes diabéticos, es la formación de tejido de granulación, debido a que las heridas crónicas de estos pacientes se caracterizan por ser hipocelulares y con una baja formación de tejido de granulación, como consecuencia de una migración y proliferación deficiente de las células, lo cual impide un correcto cierre de la herida (Greives *et al.*, 2012). En este

estudio, la aplicación tópica de TcCRT en las heridas de ratas diabéticas produjo un aumento en la formación de tejido de granulación, logrando mejores resultados con la aplicación de una concentración baja de TcCRT (2,5 ng/ μ L). La aplicación tópica de una concentración alta de TcCRT (1 μ g/ μ L) comparado con los controles negativos (que no recibieron tratamiento), no fueron significativamente diferentes a los cinco y treinta días, mostrando una menor formación de tejido de granulación. A los cinco días de cicatrización, las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT alcanzaron una altura de la neodermis dos veces mayor a las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT y las heridas no tratadas. A los treinta días, estas mismas heridas fueron las únicas que estuvieron cerca de alcanzar la altura de la dermis de la piel de una rata normal (96%). En contraste, la aplicación tópica de HuCRT en heridas *in vivo* en ratas diabéticas produjo un aumento dosis-dependiente en la formación de tejido de granulación comparado con las heridas control, logrando un mayor efecto con una concentración alta de HuCRT (5 μ g/ μ L) (Greives *et al.*, 2012).

Aún se desconoce la razón de las diferencias observadas en los estudios antes mencionados sobre los efectos de la aplicación tópica de HuCRT y la aplicación exógena de TcCRT, donde se observa un efecto proporcional a la concentración en el caso de CRT recombinante de humano, mientras que su contraparte del parásito flagelado es más efectiva a una menor concentración. Sin embargo, podría explicarse por algún dominio no homólogo entre ambas moléculas o alguna diferencia conformacional, por lo cual sería fundamental estudiar las diferencias estructurales de cada uno de los dominios de ambas proteínas, de origen humano y de *Trypanozoma cruzi*.

En esta tesis también se evaluó el efecto de la aplicación tópica de TcCRT en heridas crónicas sobre la maduración de la neodermis. Durante el proceso de cicatrización, en un inicio se produce un aumento en la celularidad de la neodermis producto de la formación de tejido de granulación, dado principalmente por la migración y proliferación de fibroblastos sintetizadores de matriz extracelular y la formación de nuevos capilares (Greives *et al.*, 2012), luego durante la fase de maduración, este tejido es gradualmente reemplazado por tejido conectivo denso y se produce apoptosis celular, lo cual conduce finalmente a una dermis relativamente acelular con propiedades físicas que son compatibles con la piel normal

(Demidova-Rice *et al.*, 2012), de modo que una menor celularidad revela una mayor madurez. En este estudio, se pudo observar que a los cinco y diez días de cicatrización las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT mostraron una celularidad significativamente mayor a las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT y las heridas control, producto de la mayor formación de tejido de granulación en comparación con los otros tratamientos. Sin embargo, al día 30 de cicatrización las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT presentaron una celularidad significativamente menor, lo cual se produciría producto del proceso de maduración de la dermis y apoptosis celular. A su vez, a los 30 días de cicatrización las heridas tratadas con una concentración baja de TcCRT presentan una menor densidad celular que tiende a ser comparable con la dermis normal de una rata. Por otro lado, las heridas control y las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT, presentaron una celularidad dos veces superior a la dermis de una rata normal. Por lo tanto, después de 30 días de cicatrización el tratamiento con una concentración baja de TcCRT (2,5 ng/μL) fue el más efectivo, alcanzando una mayor madurez de la dermis comparado con el tratamiento con una concentración alta. Estos resultados, podrían explicarse debido a que se sabe que la CRT tiene la función auspiciosa de ser el mediador obligado para la eliminación de células apoptóticas por los fagocitos (Nanney *et al.*, 2008), por lo cual la aplicación exógena de TcCRT facilitaría la remoción de estas células apoptóticas, por ende, dando lugar a una dermis con una menor celularidad, más madura.

Además, macroscópicamente la aplicación tópica de una concentración baja de TcCRT en las heridas de ratas diabéticas, produjo una disminución significativa del tamaño de las heridas y una cicatriz de mejor calidad estética, mientras que las heridas tratadas con una concentración alta de TcCRT a los treinta días mantenían un área estéticamente no recuperada incluso mayor al de las heridas control.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que 2,5 ng/μL de TcCRT es la concentración más efectiva para mejorar la cicatrización en heridas en ratas diabéticas. Además, el resultado de esta tesis reafirma el efecto de TcCRT sobre la cicatrización, mejorando la velocidad de reepitelización, la formación de tejido de granulación y la maduración de la dermis en heridas cutáneas *in vivo*, pero esta vez en un modelo experimental realizado en ratas diabéticas, augurando su potencial uso como agente terapéutico tópico en

el tratamiento de heridas crónicas. De esta manera, se acepta la hipótesis planteada en esta tesis donde se demostró que la aplicación de la proteína TcCRT mejora la cicatrización de heridas cutáneas crónicas en ratas diabéticas.

BIBLIOGRAFÍA

ARIAS, J.I.; PARRA, N.; BEATO, C.; TORRES, C.G.; HAMILTON-WEST, C.; ROSAS, C.; FERREIRA, A. 2018. Different *Trypanosoma cruzi* calreticulin domains mediate migration and proliferation of fibroblasts *in vitro* and skin wound healing *in vivo*. Arch Dermatol Res. 310: 639-650.

ARIAS, J.I.; SEPÚLVEDA, C.; BRAVO, P.; HAMILTON-WEST, C.; MALDONADO, I.; FERREIRA, A. 2015. Comparative effect of human and *Trypanosoma cruzi* calreticulin in wound healing. J. Tissue Eng. Regen. Med. 9(1):41-54.

BIELSA, I. 2006. Piel normal: Proceso de cicatrización de las heridas. Piel 21(4):207-212.

CONWAY, K.; HARDING, K. 2008. Cicatrización de las heridas en el pie diabético. **In:** Bowker, J.; Pfeifer, M. (Eds). Levin y O'Neal. El pie diabético. 7ª ed. Elsevier. Barcelona, España.

DEMIDOVA-RICE, T.; HAMBLIN, M.; HERMAN, I. 2012. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. Adv. Skin Wound Care 25(7):304–314.

FERREIRA, V.; MOLINA, MC.; VALCK, C.; ROJAS, A.; AGUILAR, L.; RAMÍREZ, G.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. 2004. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. Molecular Immunology 40(17): 1279-1291.

FRYKBERG, R.; BANKS, J. 2015. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. Adv. Wound Care. 4(9):560-582.

GOLDENBERG, R.; PUNTHAKEE, Z. 2013. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. Can. J. Diabetes. 37(1): S8-S11.

GREIVES, M.; SAMRA, F.; PAVLIDES, S.; BLECHMAN, K.; NAYLOR, S.; WOODRELL, C.; CADACIO, C.; LEVINE, J.; BANCROFT, T.; MICHALAK, M.; WARREN, S.; GOLD, L. 2012. Exogenous calreticulin improves diabetic wound healing. Wound Rep. Reg. 20:715–730.

HONARI, G.; MAIBACH, H. 2014. Skin Structure and Function. **In:** Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects. Elsevier. Estados Unidos. pp. 1-10.

HONG, S.; JIA, S.X.; XIE, P.; XU, W.; LEUNG, K.P.; MUSTOE, T.A.; GALIANO, R.D. 2013. Topically Delivered Adipose Derived Stem Cells Show an Activated-Fibroblast Phenotype and Enhance Granulation Tissue Formation in Skin Wounds. Plos One. 8(1).

NANNEY, L.; WOODRELL C.D.; GREIVES M.R.; CARDWELL, N.L.; POLLINS, A.C.; BANCROFT, T.A.; CHESSER, A.; MICHALAK, M.; RAHMAN, M.; SIEBERT, J.W.; GOLD, L.I. 2008. Calreticulin Enhances Porcine Wound Repair by Diverse Biological Effects. Am. J. Pathol. 173(3): 610-630.

VÉLEZ, S.; GÓMEZ, L.; TAPIA, D.; GUERRERO, E.; MORÁN, J. 2015. Estandarización del modelo de diabetes experimental inducida por estreptozotocina en ratas Sprague-Dawley. Rev. Méd. cient. 28(1):4-13.

ANEXO 1



CERTIFICADO N° 16

Santiago 15 de mayo 2013

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, revisó el proyecto titulado: "Modulatory activities of recombinant Trypanosoma cruzi calreticulin on normal and diabetic skin wound healing", el cual será presentado para su exanimación en el marco del concurso FONDECYT de Iniciación 2013, y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Ignacio Arias.

En el proyecto se estipulan las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- Uso de ropa adecuada para manejo de animales y uso de gabinetes de bioseguridad para experimentación con células
- 2.- Eliminación de residuos tóxicos, excretas, eliminación de carcasas de animales y basura de manera adecuada, neutralizando los desechos o incinerándolos según corresponda.
- 3.- Eliminación adecuada de ADN recombinante, productos biológicos y microorganismos.
- 4.- Limpieza de superficies y mesones con desinfectantes apropiados.
- 5.- Eliminación adecuada de elementos corto punzantes mediante cajas especiales e incineración

Con relación a lo expuesto, este comité considera que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008, y por lo tanto previene los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.



LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad



ANEXO 2



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica - CONICYT

N°018/FONDECYT MEDICINA G1/0001

Santiago, 10 ENE 2014

Señor
José Arias Fernández
Investigador Responsable Proyecto N°11130257
Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Depto. de Ciencias Clínicas
Santa Rosa #11735, La Pintana
Santiago

Estimado Sr. Arias:

Me dirijo a Ud. a fin de confirmarle que el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT revisó los antecedentes de su proyecto N°11130257 y consideró que se dio una adecuada respuesta a las observaciones planteadas.

Estos antecedentes pasaron a formar parte de su proyecto. Se envía copia de los Consentimientos Informados visados por este Comité para ser utilizados en su investigación.

Saluda atentamente a Ud.,


Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica
Directora Programa FONDECYT
MARÍA ELENA BOISIER
Directora Programa FONDECYT


SNV/pap

