



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE DOS PÉPTIDOS AISLADOS DE LA
SECRECIÓN CUTÁNEA DE LA RANA MEXICANA *Pachymedusa dacnicolor* EN
EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Verónica Martínez Osorio

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Yvonne Rosenstein
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Constance Auvynet
[Instituto de Biotecnología](#)
Dr. Gustavo Pedraza
[Instituto de Biotecnología](#)
Dra. Laura Bonifaz
[Centro Médico Nacional Siglo XXI](#)

Cuernavaca, Mor., Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DE EXAMEN

Dra. Martha Verónica Vásquez Laslop

Dra. Bertha Espinosa Gutiérrez

Dra. Denhi Schnabel Peraza

Dr. Fernando Rogel Esquivel Guadarrama

Dr. Ernesto Ortiz Suri

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, y para su desarrollo contó con fondos provenientes del Proyecto 815 de Fronteras de la Ciencia-CONACyT.

Asimismo, conté con una beca CONACYT durante la maestría (Núm. CVU: 888184).

Al Centro Estatal para la Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, Morelos, por contribuir con la materia prima para algunos de los experimentos reportados.

Se agradece el apoyo técnico de la Bio. Erika Melchy Pérez para los experimentos de citometría de flujo, y del Dr. Ángel Flores Alcantar para los experimentos *in vivo*, con ratones y microscopía. De igual forma, se agradece a la M.V.z. Maria Elena Elizabeth Mata Moreno y a la M.V.z. Graciela Margarita Cabeza Pérez por su colaboración y asesoría en el Bioterio del IBT.

A la Dra. Laura Bonifaz por su asesoría como tutora de la presente tesis, por sus valiosos comentarios y aportes, y por proporcionar varias de las líneas celulares utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Gustavo Pedraza por su aportación como tutor de esta tesis, y por sus observaciones e ideas que ayudaron a construirla.

A la Dra. Constance Auvynet por formular la idea inicial de este proyecto, y por su guianza y asesoría a lo largo de todo el desarrollo de este.

A la Dra. Yvonne Rosenstein quien, como tutora principal, supervisó y guió el curso de esta investigación, así como la redacción y presentación final de la tesis.

Finalmente, a todos los miembros del laboratorio de inmunología YR, que de alguna u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo; Elizabeth Fajardo, Jose Ignacio Veytia, Ivan Carranza, Alicia Cañas, Stephania Alemán, Monserrat Sandoval, Daniela Vega, Sara Sarmientos, Den Alvarado, Emmanuel Castañeda y Alan Fuentes.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papas, porque sin ellos no sería la persona que soy hoy. Gracias por fomentar en mí el amor al estudio y a la ciencia. Por apoyarme siempre en todas mis decisiones. Por cuidarme y siempre estar presentes para todo lo que he necesitado. Por todo el amor que me han dado desde que nací, y por hacer que confiara en mis capacidades. No puedo pedirle a la vida mayor privilegio que ser su hija.

A Nicholay, mi compañero de vida. Gracias por todo tu apoyo, y por compartir esta experiencia conmigo. Espero que vivamos muchas otras más juntos. Fuiste clave en este proceso, y me ayudaste en muchos sentidos a salir adelante.

A mi hermano Camilo por ser mi guía espiritual y por acompañarme en todo este proceso. Eres una de las personas que más admiro en el mundo. Que suertuda soy al tenerte como hermano.

A la Dra. Yvonne Rosenstein por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de aprender de ella. Por creer en mi y por enseñarme tantas cosas, no sólo en el ámbito académico sino también ético y moral.

A la Dra. Constance Auvynet por confiar en mí, enseñarme y apoyarme en mi desarrollo profesional. Muchas gracias por tratarme siempre con tanta amabilidad y paciencia. Junto con la Dra. Yvonne constituyes un ejemplo a seguir para mí.

A Eli, mi hermanita de laboratorio, tuve la suerte de trabajar contigo durante todo este tiempo, pero mi mayor fortuna fue haber tenido la oportunidad de conocer la maravillosa persona que eres.

A Davi, por hacerme sentir como en casa. Tú y Eli se convirtieron en mi familia mexicana.

A Nacho, Dani, Steph y Monse, por hacer tan amena mi estancia en el laboratorio. Gracias por tenerme tanta paciencia, aprendí mucho de todos ustedes y fueron un apoyo muy importante para mí.

Por último, quisiera agradecer a mis compañeros de la maestría y demás personas que de alguna u otra forma estuvieron presentes durante estos dos años. A todos ustedes por enseñarme tanto sobre su cultura. Me hicieron amar al IBT y a México.

Resumen

La angiogénesis se entiende como el proceso mediante el cual se da la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vascularización preexistente. Aunque la angiogénesis se da normalmente bajo condiciones fisiológicas, cuando ocurre un desbalance entre las moléculas que controlan que este proceso se dé en el tiempo y en el lugar correcto, pueden desarrollarse patologías, muchas de las cuales están asociadas directamente con la exacerbación de procesos inflamatorios. De esta manera, la inflamación y la angiogénesis se encuentran involucradas en un bucle de retroalimentación positiva que constituye el marco de enfermedades como la artritis reumatoide, algunas retinopatías y la psoriasis. Aunque se ha propuesto el uso de moléculas anti-angiogénicas para el tratamiento de este tipo de padecimientos, resulta difícil consolidar tratamientos en los que además de evitar la angiogénesis se logre disminuir la inflamación, sin comprometer el sistema inmunológico del organismo.

En este proyecto se trabajó con el péptido N, originalmente aislado de la secreción cutánea de la rana *Pachymedusa dacnicolor*, el cual, junto con sus variantes, el péptido Na (forma carboxiamidada) y el péptido K12A, presentan propiedades antimicrobianas e inmunosupresoras. Teniendo en cuenta la asociación entre inflamación y angiogénesis, se decidió evaluar el potencial anti-angiogénico de estos péptidos. Mediante el uso de modelos *ex vivo* e *in vitro* fue posible determinar el efecto inhibitorio de los péptidos en la angiogénesis, al igual que el rango de concentraciones óptimas para su actividad. Además, se logró obtener información del posible mecanismo de acción de los péptidos, el cual probablemente implique la inducción de la muerte celular de varios tipos de células importantes para la angiogénesis, como los son los fibroblastos y las células inflamatorias. Por último, se probó la efectividad del péptido N en un modelo *in vivo* de psoriasis inducida por Imiquimod en ratones y se demostró que la aplicación tópica de este péptido, además de tener un efecto anti-angiogénico en la piel, disminuyó considerablemente el infiltrado celular en el tejido, aunque, no se detectaron cambios significativos del estado inflamatorio del organismo a nivel sistémico. Así, considerando las propiedades antiinflamatoria, antimicrobiana y anti-angiogénica de estos péptidos, se propone su uso potencial para desarrollar tratamientos de padecimientos inflamatorios asociados con un proceso angiogénico importante, sin el riesgo de volver al organismo más vulnerable a infecciones oportunistas.

Abstract

Angiogenesis is understood as the process of formation of new blood vessels from pre-existing vasculature. Although angiogenesis normally takes place under physiological conditions, when there is a dysregulation of the molecules that control the timing and place for angiogenesis to occur, it can lead to the development of certain pathologies that are mostly directly associated with the exacerbation of inflammatory processes. Therefore, inflammation and angiogenesis are involved in a positive feedback loop that constitutes the hallmark for many diseases such as rheumatoid arthritis, several types of retinopathies and psoriasis. Although the use of anti-angiogenic molecules has been proposed to treat this type of diseases, it is hard to obtain compounds able to inhibit angiogenesis that at the same time can diminish inflammation without compromising the immune system of the organism.

In this project, we worked with peptide N, originally isolated from the skin secretion of the frog *Pachymedusa dacnicolor*, which, along with its two variants, Na (carboxiamidated form) and K12A, has antimicrobial and immunosuppressive properties. Considering the association between inflammation and angiogenesis, we decided to evaluate the antiangiogenic potential of these peptides. The experimental results allowed to determine the inhibitory effect of the peptides in the process of angiogenesis, as well as the range of optimal concentrations for their activity, which was achieved using *ex vivo* and *in vitro* models. Furthermore, we obtained information about the possible mechanism of action of the peptides, which probably involves the induction of the cell death of some types of cells that are important for angiogenesis, such as fibroblasts and inflammatory cells. Finally, we proved the effectiveness of peptide N in an *in vivo* model of Imiquimod-induced psoriasis in mice and we demonstrated that the topical administration of this peptide, not only had an antiangiogenic effect on the skin, but also considerably decreased the cellular infiltrate in the tissue. However, no significant changes in the systemic inflammation were observed. Hence, considering the anti-inflammatory, antimicrobial, and antiangiogenic properties of these peptides we postulate them as potential candidates for the treatment of inflammatory diseases that involve an important angiogenic process, without taking the risk of making the organism more prone to opportunistic infections.

Contenido

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Abreviaturas.....	9
1. Introducción.....	11
1.1. Mecanismo de la angiogénesis.....	11
1.1. Las células endoteliales.....	14
1.2. El papel de los fibroblastos en la angiogénesis.....	15
1.3. Las células del sistema inmunológico en la angiogénesis.....	17
1.3.1. Neutrófilos.....	17
1.3.2. Monocitos y macrófagos.....	17
1.3.3. Células dendríticas.....	18
1.3.4. Mastocitos.....	18
1.3.5. Basófilos.....	18
1.3.6. Eosinófilos.....	19
1.4. La psoriasis, una enfermedad inflamatoria de la piel.....	19
1.5. El modelo de psoriasis inducida por Imiquimod.....	23
1.6. Los péptidos de la piel de rana con propiedades inmunomoduladoras.....	25
2. Antecedentes.....	27
3. Hipótesis.....	31
4. Objetivo general.....	31
5. Objetivos específicos.....	31
6. Materiales y métodos.....	32
6.1. Síntesis de péptidos.....	32
6.2. Animales.....	32
6.3. Ensayos de angiogénesis con el modelo de anillos aórticos.....	32
6.4. Cultivo y preparación de células.....	33
6.4.1. Células TeloHAEC.....	33
6.4.2. Fibroblastos NIH-3T3.....	34
6.4.3. Fibroblastos humanos.....	34
6.4.4. HaCaT.....	34

6.5.	Ensayos de muerte celular	35
6.5.1.	Azul tripano	35
6.5.2.	Cristal violeta	35
6.5.3.	Citometría de flujo	36
6.6.	Ensayo de formación de tubos	37
6.7.	Ensayo <i>in vivo</i> de psoriasis inducida por Imiquimod	38
6.7.1.	Inducción de psoriasis en ratones	38
6.7.2.	Citometría de flujo	39
6.7.3.	Ensayo de Multiplex.....	39
6.7.4.	Análisis de vascularización de la piel y estimación de índice de psoriasis	40
6.7.5.	Histología de piel	41
7.	Resultados	42
7.1.	El péptido N y sus variantes Na y K12A inhiben el proceso de angiogénesis <i>ex vivo</i> de manera dependiente de dosis.	42
7.2.	El péptido N y sus variantes Na y K12A afectan la viabilidad de los fibroblastos y en menor medida la de las células endoteliales <i>in vitro</i>	44
7.3.	Ninguno de los péptidos afecta la estructura de la red tubular una vez establecida.	45
7.4.	El péptido Na, mas no los péptidos N y K12A, inhibe la formación de tubos por las células endoteliales.	47
7.5.	Aplicación del péptido N en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod en ratón... ..	50
7.5.1.	Efecto del péptido N en la estructura de la piel e infiltrado celular.	51
7.5.2.	Efecto del péptido N en la angiogénesis <i>in vivo</i>	55
7.5.3.	Los péptidos N, Na y K12A afectan la viabilidad de los fibroblastos dérmicos y queratinocitos humanos.....	60
8.	Discusión.....	63
9.	Conclusiones	69
10.	Perspectivas	69
11.	Referencias.....	70
12.	Anexos	75

Abreviaturas

- bFGF:** basic Fibroblasts Growth Factor (Factor de crecimiento de fibroblastos básico)
- CCL-2:** Chemokine Ligand 2 (Ligando de quimiocina 2)
- CXCL2:** Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2 (Ligando de quimiocina 2 con motivo C-X-C)
- CXCL8:** Chemokine (C-X-C motif) Ligand 8 (Interleucina 8)
- DMEM:** Dulbeccos's Modified Eagle Medium (Medio de Eagle modificado por Dulbecco)
- DMSO:** Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)
- EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetracético)
- FBS:** Fetal Bovine Serum (Suero fetal bovino)
- FGF:** Fibroblasts Growth Factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)
- GM-CSF:** Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)
- hCG:** Human Chorionic gonadotropin (Gonadotropina coriónica humana)
- IFN- α :** Interferon- α (Interferón α)
- IL-1 β :** Interleukin-1 β (Interleucina 1 β)
- IL-6:** Interleukin-6 (Interleucina 6)
- IL-8:** Interleukin-8 (Interleucina 8)
- IRF:** Interferon regulatory factors (Factores reguladores de interferon)
- LPS:** Lipopolysaccharide (Lipopolisacárido)
- MMP:** Matrix Metalloproteinase (Metaloproteinasa de matriz)
- MPB:** Major Basic Protein (Proteína básica principal)
- MyD88:** Myeloid Differentiation primary response 88 (Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88)
- NBCS:** Newborn Calf Serum (Suero de ternero recién nacido)
- NF κ B:** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
- PBS:** Phosphate-buffered saline (Solución salina tamponada de fosfato)
- PDGF:** Platelet-derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PFA: Paraformaldehyde (Paraformaldehído)

TGF β : Transforming Growth Factor Beta (Factor de crecimiento transformante beta)

TLR: Toll-Like Receptor (Receptor tipo toll)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)

TRAF: TNF receptor-associated factor (Factor asociado a receptor de TNF)

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (Molécula de adhesión celular vascular 1)

VCBM: Vascular Cell Basal Medium (Medio celular vascular basal)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento vascular endotelial)

1. Introducción

La angiogénesis se define como el proceso mediante el cual se da la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. Dicho proceso ocurre de manera normal durante las etapas tempranas del desarrollo de un organismo, en eventos de cicatrización y a lo largo del ciclo reproductivo en los órganos sexuales femeninos de un individuo adulto. La angiogénesis es estrictamente regulada por una serie de factores que, en conjunto, determinan el lugar, la magnitud y la temporalidad en los que se desarrollan los eventos de vascularización. Sin embargo, en algunos casos ocurren alteraciones que perturban los mecanismos de control de la angiogénesis, lo que conlleva a la progresión de trastornos deletéreos. Entre los padecimientos que resultan de la desregulación de la angiogénesis se encuentran el cáncer y varias enfermedades inflamatorias como lo son la artritis reumatoide, diferentes clases de retinopatías y la psoriasis, en las cuales la formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial para el desarrollo de la afección. En este orden de ideas, resalta la importancia del estudio de la angiogénesis bajo una perspectiva que permita dilucidar los mecanismos de su regulación y cómo estos podrían ser manipulados para tratar el tipo de enfermedades mencionadas anteriormente.

1.1. Mecanismo de la angiogénesis

La estructura básica de un vaso sanguíneo consiste en tres capas que forman las paredes del tubo por donde circula la sangre: la túnica adventicia, la túnica media y la túnica íntima. La composición de estas tres capas varía dependiendo del tipo de vaso sanguíneo. Los vasos sanguíneos pueden ser clasificados con base en la composición de la sangre que transportan. Así, las arterias llevan la sangre oxigenada desde los pulmones al resto de las partes del cuerpo, y las venas recogen la sangre con dióxido de carbono desde los órganos hasta los pulmones. En ambos casos, la sangre debe pasar por el corazón que proporciona la fuerza necesaria, bombeando la sangre hacia los diferentes lugares donde se requiere. Además, las venas y las arterias se subclasifican según la proporción del tipo de tejido que los conforma y su tamaño en: arterias elásticas, arterias musculares, arteriolas, vénulas, venas y capilares (**Tabla 1.1**). Estos últimos forman una red en donde se da el intercambio gaseoso y el oxígeno proveniente de los pulmones logra ser distribuido a los tejidos. Los capilares

también recogen el dióxido de carbono producto del metabolismo celular, y su flujo sanguíneo desemboca en las venas que llevan la sangre de nuevo a los pulmones para su oxigenación.

Tipo de vaso sanguíneo	Diámetro del lumen	Grosor de la pared	Proporción de tejidos
Aorta	2,5 cm	2 mm	
Arteria	0,4 cm	1 mm	
Arteriola	30 μm	20 μm	
Esfínter	35 μm	30 μm	
Capilar	8 μm	1 μm	
Vénula	20 μm	2 μm	
Vena	0,5 cm	0,5 mm	
Vena cava	3 cm	1,5 mm	

■ Endotelial
■ Elástico
■ Muscular
■ Fibras de colágeno

Tabla 1.1. Características principales de los diferentes tipos de vasos sanguíneos y la proporción de los tejidos que los conforman en humanos. Adaptado de Burton (1954).

En un proceso de angiogénesis, los capilares son los primeros en formarse, y sus componentes son los modelos por excelencia para el estudio e investigación en el área de la angiogénesis. Siendo los vasos sanguíneos más pequeños, con un diámetro promedio de 8 μm, los capilares están formados por una monocapa de células endoteliales (epitelio escamoso) que reposa sobre una lámina basal rica en laminina, colágeno tipo IV y proteoglicanos, y que está recubierta por células de soporte llamadas pericitos. Es importante mencionar que las células endoteliales se caracterizan por ser uno de los tipos celulares más estables con una baja tasa de proliferación. En un individuo adulto tan solo el 0.01% de las células endoteliales se encuentran en división (Carmeliet & Jain, 2011). Sin embargo, estas células logran proliferar rápidamente ante estímulos angiogénicos, llegando a igualar la tasa de proliferación de las células de la médula ósea, esto con el fin de permitir la formación adecuada de nuevos vasos sanguíneos (Kalluri, 2003).

Las etapas por las que progresa un proceso angiogénico son varias (**Fig 1.1**): **1)** Las células endoteliales que forman las paredes de los vasos sanguíneos, reciben señales angiogénicas provenientes de una célula hipóxica, inflamatoria o tumoral. **2)** Los pericitos, que actúan como células de soporte en los vasos sanguíneos, se liberan de la membrana basal en respuesta a las señales angiogénicas, mediante la degradación de la matriz extracelular por proteasas específicas. Esto ocurre al mismo tiempo que las células endoteliales debilitan sus uniones intercelulares, permitiendo la dilatación del vaso y el incremento de su permeabilidad. **3)** Hay una extravasación de proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno y la fibronectina, que conforman una matriz extracelular provisional. **4)** Se da la migración ordenada de las células endoteliales hacia esta matriz extracelular provisional, dirigidas por la célula punta o guía que desarrolla filopodios para reconocer el camino por el cual guiará la migración de las demás células. **5)** Las células adyacentes a la célula punta, llamadas células tallo, empiezan a dividirse, haciendo posible la elongación del tallo (prolongación naciente del vaso original que será el nuevo vaso sanguíneo). A partir de este momento, se establece una comunicación entre las células para la transmisión de información espacial que permite la migración y elongación del tallo. **6)** Las células mieloides actúan como mediadoras en la fusión de dos tallos elongados, permitiendo con esto el inicio del flujo sanguíneo. **7)** Por último, se restablece el estado inicial de las células endoteliales y de los pericitos para el establecimiento del nuevo vaso sanguíneo. Los inhibidores de proteasas permiten la deposición normal de la membrana basal.

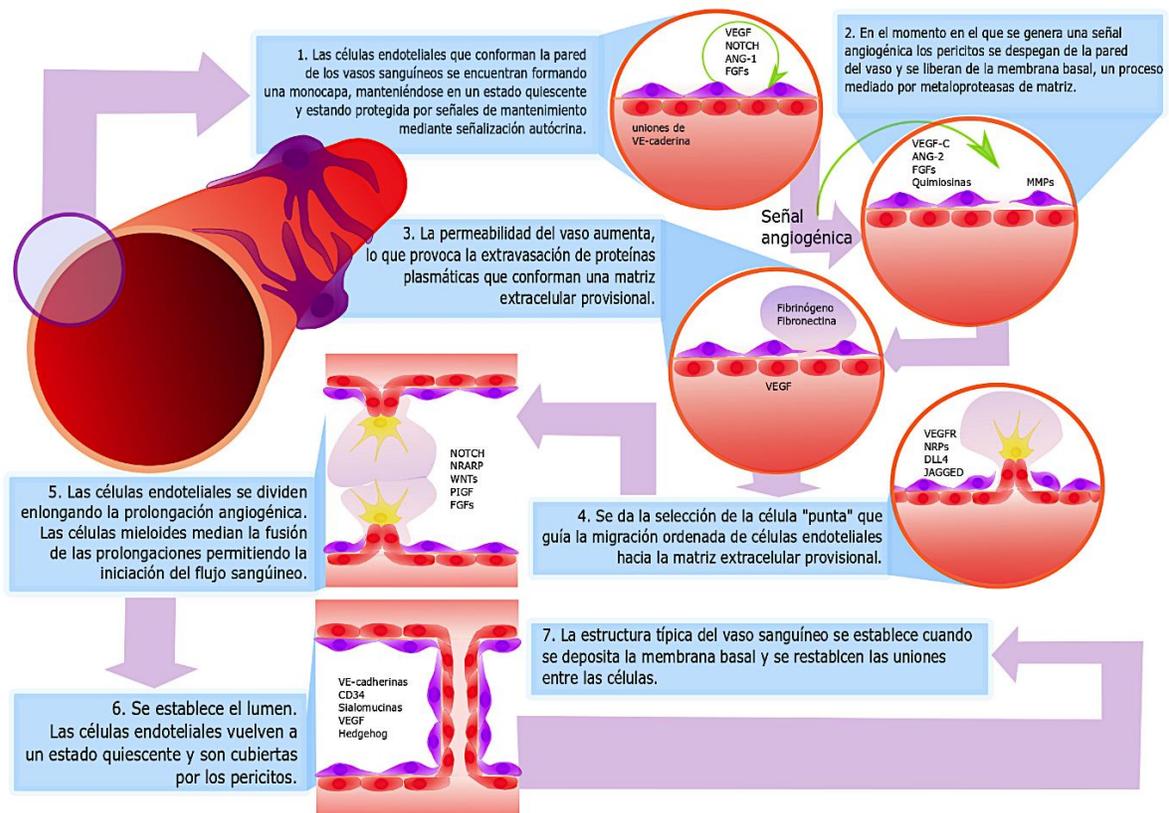


Figura 1.1. Principales etapas de un proceso angiogénico. Adaptado de Carmeliet & Jain (2011).

El estímulo angiogénico puede provenir de diferentes fuentes, pudiendo tratarse de una célula que se encuentre bajo condiciones de hipoxia, una célula tumoral, una célula inflamatoria o los fibroblastos que a su vez hayan sido estimulados por alguna de estas señales. La señal angiogénica generada por estas células usualmente consiste en factores de crecimiento (VEGF, bFGF, PDGF, VEGF-C, VEGF-D, TGF β), citocinas (IL-1 β , TNF, CXCL8, IL-6), quimiocinas (CXCL2) y metaloproteinasas de matriz (MMPs) que, en conjunto, desencadenan la respuesta angiogénica (Carmeliet & Jain, 2011).

1.1. Las células endoteliales

Las células endoteliales son el principal tipo celular involucrado en la angiogénesis ya que constituyen las paredes de los vasos sanguíneos. Además, la expresión diferencial de receptores y

moléculas de adhesión en la membrana les confiere a las células endoteliales la polaridad necesaria para regular la permeabilidad de la pared vascular. Así, además de constituir el soporte estructural para la formación de los tubos por los cuales fluye la sangre, estas células pueden regular el paso de proteínas, nutrientes, gases e incluso células entre el lumen de los capilares y los tejidos.

Equipadas con todas estas funciones, las células endoteliales son capaces de responder ante un estímulo inflamatorio mediante diferentes formas. En primer lugar, si ocurre la señalización necesaria para que se dé el reclutamiento de células del sistema inmunológico en cualquier tejido, se promueve la expresión de varias moléculas en la membrana luminal de las células endoteliales como la E-selectina, la P-selectina y la ICAM-1, que encuentran sus ligandos en la membrana de las células inflamatorias, permitiéndoles atravesar la pared de los capilares mediante el proceso conocido como extravasación. En segundo lugar, las células endoteliales también son capaces de detectar un estímulo hipóxico al cual responden usualmente pasando a un estado de activación, en el que adquieren las características fenotípicas necesarias para llevar a cabo el proceso de angiogénesis, como se describió en el apartado anterior. Finalmente, la comunicación que mantienen las células endoteliales con los otros tipos celulares que pueden encontrarse en su microambiente, como los pericitos, los fibroblastos e incluso las células del sistema inmunológico, es fundamental para que eventos como la angiogénesis o la extravasación de leucocitos se regule de manera adecuada.

1.2. El papel de los fibroblastos en la angiogénesis

Los fibroblastos son parte importante del tejido conectivo. Estas células de origen mesodérmico son las encargadas de producir la matriz extracelular mediante la secreción de proteínas y polisacáridos. En general, los fibroblastos pueden producir varios tipos de colágeno. Además de producir cerca del 90% del colágeno de la matriz extracelular, los fibroblastos también participan activamente en la organización y mantenimiento estructural de la matriz. Entre los proteoglicanos producidos por los fibroblastos se encuentran la decorina, el biglicano y la fibromodulina.

Los fibroblastos producen también varias proteínas implicadas en la migración y señalización celular. Entre estas proteínas se encuentra la fibronectina, una glicoproteína que facilita la adhesión y la migración celular a través de la matriz extracelular. Asimismo, los fibroblastos juegan un papel muy

importante en un proceso inflamatorio, y son fundamentales en eventos de respuesta al daño tisular y su sanación, pues son estimulados por señales inflamatorias que a su vez promueven el reclutamiento de células del sistema inmunológico y la vascularización (Ben-Av, Crofford, Wilder, & Hla, 1995; Erez, Truitt, Olson, & Hanahan, 2010).

Además del papel secretor que tienen para la construcción de la matriz extracelular, los fibroblastos también secretan un conjunto de factores de crecimiento pertenecientes a la familia de los FGFs fundamentales para el proceso de angiogénesis. Estos factores de crecimiento intervienen en la señalización previa a varias de las etapas angiogénicas, como la degradación de la lámina basal, la migración celular, la proliferación, la morfogénesis y la maduración de los vasos sanguíneos (Sozzani, Rusnati, Riboldi, Mitola, & Presta, 2007). Se ha demostrado que las células endoteliales cultivadas sobre Matrigel (extracto de membrana basal) son incapaces de formar tubos en ausencia de FGFb, lo cual es un indicador de la importancia de este factor en la angiogénesis (Montesano, Vassalli, Baird, Guillemin, & Orci, 1986). Algo similar ocurre en el contexto tumoral, en el que los FGFs inducen la angiogénesis, promoviendo el crecimiento de la masa tumoral (Compagni, Wilgenbus, Impagnatiello, Cotton, & Christofori, 2000).

Los fibroblastos se encuentran en constante interacción con las células endoteliales y las células inflamatorias. Cuando las células endoteliales que componen la microvasculatura de la piel son activadas por señales inflamatorias como IL-1 β , TNF e IFN- γ , expresan niveles mayores de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, las cuales favorecen la extravasación de leucocitos al tejido. Las células endoteliales de la piel también secretan una mayor cantidad de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, CCL-2, IL-8, las cuales son percibidas por sus respectivos receptores en la superficie de los fibroblastos. A su vez, los fibroblastos adquieren un fenotipo proinflamatorio, secretando más citocinas inflamatorias (IL-6, CCL-2, IL-8) y metaloproteinasas de matriz como MMP1 y MMP2. Esta serie de eventos establece un microambiente inflamatorio en el que el proceso de angiogénesis es posible gracias a la remodelación de la matriz extracelular, y a la migración y proliferación de las células endoteliales. Este microambiente también promueve el reclutamiento de células del sistema inmunológico que llegan al tejido y acentúan la inflamación (Sanchez et al., 2019).

1.3. Las células del sistema inmunológico en la angiogénesis

1.3.1. Neutrófilos

Los neutrófilos son los granulocitos más abundantes en circulación y hacen parte de la primera línea de defensa frente a una invasión microbiana. El papel de los neutrófilos en el proceso de angiogénesis en un contexto inflamatorio es crucial. Durante la inflamación, los neutrófilos migran hacia el tejido, atravesando las paredes de los vasos sanguíneos, y una vez allí, desempeñan varias funciones. Estas células son una fuente importante de factores pro-angiogénicos como VEGF, IL-8, TNF, hCG y MMP9. A su vez, el VEGF promueve la migración de estas mismas células, reforzando la señalización inflamatoria y angiogénica en las áreas en donde hay acumulación de neutrófilos (Noonan, De Lerma Barbaro, Vannini, Mortara, & Albin, 2008). Asimismo, los neutrófilos son determinantes en los procesos angiogénicos. Varios experimentos han demostrado que la angiogénesis se retrasa cuando se inhibe el reclutamiento de neutrófilos. De hecho, los neutrófilos a menudo son blancos terapéuticos en terapias anti-angiogénicas (Noonan et al., 2008). Por ejemplo, existen reportes de varios compuestos, como algunos antibióticos de tipo β -lactamasa, la hiperperforina y las catequinas que se encuentran en el té verde que, al afectar la viabilidad, la activación y/o la capacidad quimiotáctica de los neutrófilos, también logran inhibir la angiogénesis mediada por estas células (Dell'Aica et al., 2007, 2006; Donà et al., 2003).

1.3.2. Monocitos y macrófagos

Los monocitos y los macrófagos son componentes clave del sistema inmunológico innato y están involucrados en la regulación del inicio, desarrollo y resolución de muchos trastornos inflamatorios. Estas células también desempeñan importantes funciones inmunorreguladoras y reparadoras de tejidos para abatir las reacciones inmunes y promover la regeneración de tejidos. Los macrófagos tienen la capacidad de responder de múltiples maneras, dependiendo del contexto en el que se encuentren. Su plasticidad les permite integrar las señales de estímulos específicos que reciben, y adoptar un determinado fenotipo mediante un proceso conocido como polarización. De esta manera, los macrófagos pueden polarizarse principalmente hacia dos fenotipos: M1, o proinflamatorios, y M2, o antiinflamatorios. De estos dos fenotipos, el M2, que resulta de la estimulación principalmente con IL-4 e IL-10, se asocia con reparación de heridas, supresión de la

respuesta inmunológica adaptativa y la angiogénesis (Ribatti & Crivellato, 2009). Los macrófagos M2 tienen la capacidad de promover la migración de las células endoteliales y la formación de estructuras tubulares, mediante la producción de VEGF-A, FGF-2 y PlGF (Jetten et al., 2014).

1.3.3. Células dendríticas

Aparte de su función como células presentadoras de antígeno profesionales y de su función reguladora en el proceso inflamatorio, las células dendríticas pueden producir un conjunto de factores tanto pro-, como anti-angiogénicos, dependiendo del microambiente en el que se encuentren. Así, mientras que las células dendríticas activadas por moléculas proinflamatorias como el LPS, la IL-1 y el TNF adquieren un fenotipo asociado con la respuesta de tipo Th1, aquellas estimuladas simultáneamente por factores pro- y antiinflamatorios adquieren un estado alternativo de activación. Dicho estado alternativo de activación promueve la regulación de la angiogénesis, la cual está principalmente mediada por VEGF-A. Además, las precursoras de las células dendríticas conservan la capacidad de transdiferenciarse a células con un fenotipo parecido a las células endoteliales que contribuyen a la vasculogénesis (Sozzani et al., 2007).

1.3.4. Mastocitos

Pertenecientes al linaje mieloide, estas células desempeñan funciones reguladoras asociadas a la vasodilatación, homeostasis vascular, tolerancia inmunológica, alergias, y la respuesta a patógenos. Los gránulos presentes en los mastocitos contienen varios factores pro-angiogénicos que son liberados al medio cuando las células son estimuladas. Durante la desgranulación, moléculas como VEGF, FGF-2, serin-proteasas como la tripsina y la quimasa, la histamina y la heparina contribuyen a efectuar todos los cambios necesarios para que se lleve a cabo la angiogénesis. Por un lado, los factores de crecimiento promueven la proliferación y la migración de las células endoteliales, y por el otro, las proteasas ayudan a modificar la matriz extracelular para facilitar la migración celular, liberando también los demás factores de crecimiento que se encuentran retenidos en dicha matriz (Noonan et al., 2008).

1.3.5. Basófilos

Siendo el tipo más escaso de granulocitos en la circulación, los basófilos están involucrados en varios procesos inmunológicos como la estimulación de los linfocitos T CD4+ y la presentación de antígenos. Los basófilos pueden producir VEGF-A y VEGF-B, expresando también los receptores VEGFR-2 y el correceptor neuropilin 1, lo cual los hace responsivos al efecto quimioatrayente del VEGF, y los involucra en una retroalimentación positiva para la producción de este factor de crecimiento promotor de la angiogénesis (Noonan et al., 2008). Estas células también liberan histamina, la cual aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos, permitiendo con esto la extravasación de los componentes que construyen una matriz extracelular temporal que, a su vez, funciona como andamiaje para la migración de las células endoteliales en la angiogénesis.

1.3.6. Eosinófilos

Los eosinófilos, que bajo condiciones normales conforman el 1% de los leucocitos circulantes, participan en la defensa contra parásitos y son especialmente importantes en las reacciones alérgicas y las enfermedades autoinmunes. Los eosinófilos producen un conjunto de factores pro-angiogénicos y proinflamatorios como VEGF, FGF-2, TNF, GM-CSF, NGF, IL-8 y angiogenina. Estas células liberan VEGF al ser estimuladas por GM-CSF e IL-5 y promueven la proliferación de células endoteliales mediante la MBP de eosinófilos (Puxeddu et al., 2009). Además, producen MMP9, una metaloproteasa que participa en la remodelación de la matriz extracelular que ocurre durante la angiogénesis.

1.4. La psoriasis, una enfermedad inflamatoria de la piel

Las células inflamatorias constituyen una de las primeras líneas de defensa para contender con posibles infecciones y restaurar la homeostasis. Sin embargo, el desbalance en las proporciones de estas células, así como de las moléculas que producen, favorece el desarrollo de lesiones y daño tisular nocivos para el organismo. En este tipo de procesos patológicos, la angiogénesis desempeña frecuentemente un papel fundamental al ser el vehículo que permite la migración de las células inflamatorias a los tejidos, y que además las suplementa con el oxígeno y los nutrientes necesarios para su mantenimiento y proliferación. Más aún, las mismas células inflamatorias son capaces de secretar factores angiogénicos, lo que envuelve a los procesos de inflamación y angiogénesis en un bucle de retroalimentación positiva (Jackson, Seed, Kircher, Willoughby, & Winkler, 1997). La

desregulación en la angiogénesis puede dar pie al desarrollo de enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la degeneración macular o enfermedades de la piel como la psoriasis.

La psoriasis se considera como una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, en la que se observa una respuesta exacerbada del sistema inmunológico innato y adaptativo (Lowes, Suárez-Far, & Krueger, 2014). Se estima que afecta del 1% al 3% de la población a nivel mundial (Huerta, Rivero, & García Rodríguez, 2007). En las primeras etapas de la enfermedad, los queratinocitos juegan un papel muy importante, ya que, al ser estimulados por factores intrínsecos y extrínsecos, producen una serie de agentes quimio-atrayentes y pro-inflamatorios que promueven el reclutamiento de células inmunitarias como neutrófilos, monocitos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T (Langley et al., 2014). Esto, a su vez, induce la producción de citocinas proinflamatorias que promueven la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos. La activación persistente de estas células conlleva a la formación de placas psoriásicas y a la angiogénesis (**Fig 1.2.**). El desarrollo de las placas psoriásicas, como producto de la multiplicación rápida y excesiva de las células de la epidermis, conlleva a una severa descamación de la piel (Harden, Krueger, & Bowcock, 2015).

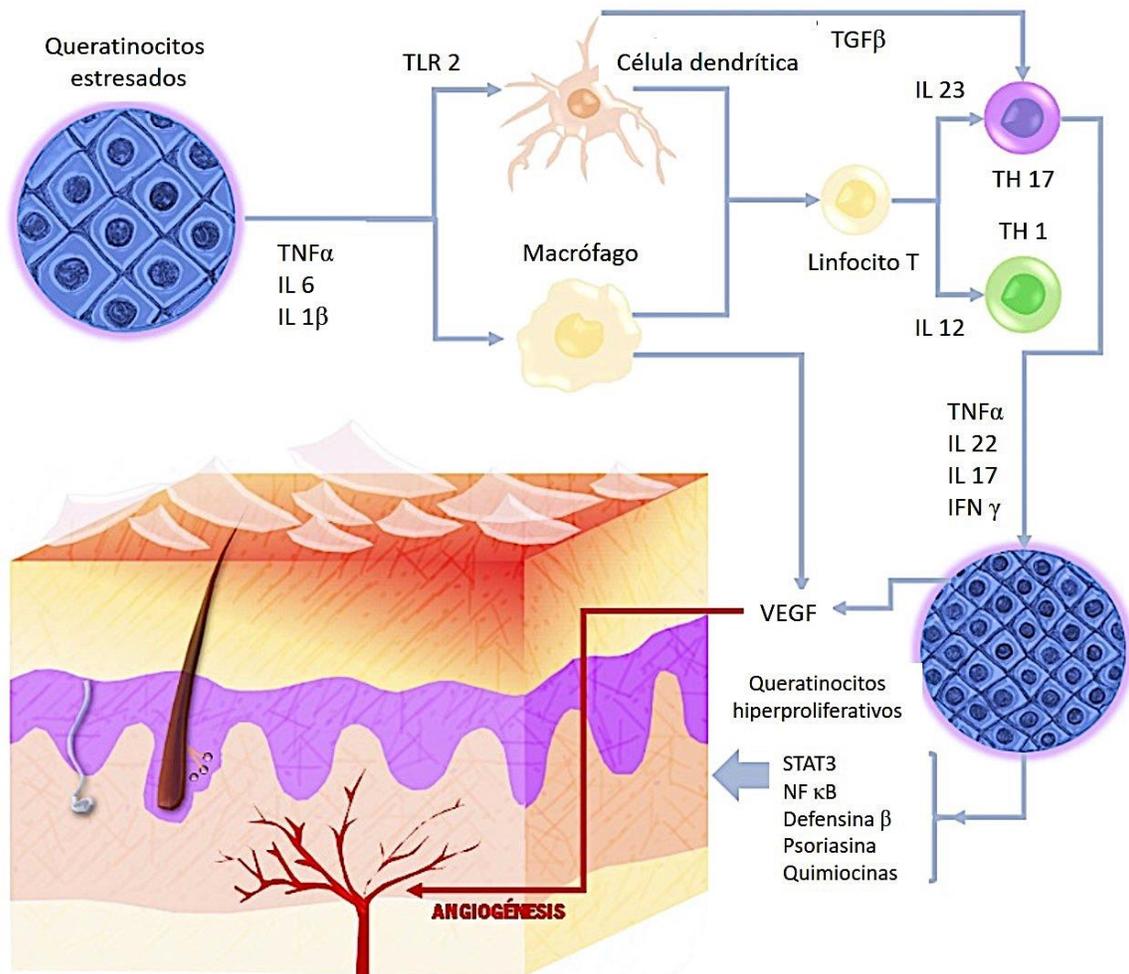


Figura 1.2. Proceso inflamatorio en la psoriasis. Los queratinocitos que se encuentran en la epidermis responden ante factores intrínsecos (predisposición genética o fallas en el sistema inmunológico) o extrínsecos (factores ambientales, microbios y el uso de ciertas drogas) y, en consecuencia, empiezan a producir factores que activan a su vez otros tipos celulares como las células dendríticas, los macrófagos y las células T. Estas células son a su vez estimuladas para producir citocinas y factores que conllevan al progreso de la enfermedad, entre los que se encuentra el VEGF que estimula la angiogénesis. Adaptado de Arora (2016).

La respuesta inmunitaria exacerbada característica de la psoriasis se puede deber a varios factores. En primer lugar, se encuentran los factores genéticos. Se han descrito nueve *loci* de susceptibilidad para esta enfermedad, asociados a factores inmunitarios, como lo es el PSORS1, responsable del 50% de los casos de psoriasis (Nickoloff & Nestle, 2004). Además, estudios genómicos han demostrado que variaciones genéticas en el MHC, el receptor de interleucina 23 (IL-23R) y la interleucina 12B (IL-12B) están asociados a un mayor riesgo de padecer de esta enfermedad (Liu et

al., 2008). En segundo lugar, están los factores infecciosos. Frecuentemente, la psoriasis se presenta después de una infección nasofaríngea estreptocócica, lo que puede estar relacionado directamente con la activación de linfocitos T a partir de un antígeno bacteriano (Griffiths & Barker, 2007). Además de los componentes genéticos e infecciosos, los factores ambientales como el estrés, el tabaquismo, el consumo de alcohol y el uso de algunos medicamentos pueden aumentar el riesgo de padecer de esta enfermedad.

Actualmente los tratamientos que existen contra la psoriasis se pueden agrupar en tres tipos principalmente: tópicos, orales o inyectados, y la fototerapia. Los tratamientos tópicos y los orales o inyectados consisten básicamente en corticosteroides e inmunosupresores que buscan atenuar la inflamación (Greaves & Winstein, 1995). La fototerapia se basa en la exposición de la piel afectada a la radiación UVB, con la finalidad de inhibir la proliferación de los queratinocitos; al mismo tiempo, esta forma de radiación ejerce un efecto inmunomodulador que se desencadena por la muerte inicial de los linfocitos T (los cuales presentan hipersensibilidad a la radiación UV si se los compara con otros tipos de células como los queratinocitos, monocitos y linfocitos B) y una subsecuente migración de linfocitos T CD4+ al tejido irradiado, donde después se favorece la polarización hacia un fenotipo Th2 y la inducción de linfocitos T reguladores. Por otro lado, con la radiación UV, la funcionalidad de las células presentadoras de antígeno en el tejido también se inhibe (Carrascosa et al., 2011; Duthie, Kimber, & Norval, 1999).

Sin embargo, estos tratamientos frecuentemente tienen efectos secundarios que pueden llegar a ser graves para la salud ya que se compromete el sistema inmunológico del organismo, lo que hace al cuerpo más vulnerable ante infecciones oportunistas. Cuando un paciente que padece de psoriasis se enferma por alguna infección, así sea una gripe sencilla, es necesario suspender el tratamiento de la psoriasis durante el tiempo que dure la enfermedad, lo cual resulta en una nueva crisis de psoriasis algunas semanas después. Por otro lado, la infraestructura necesaria para llevar a cabo la fototerapia puede constituir una limitante, ya que no todos los establecimientos de salud cuentan con ella. Todos estos impedimentos para el tratamiento de la psoriasis evidencian la necesidad de encontrar nuevas terapias que sean más accesibles, asequibles y eficientes.

1.5. El modelo de psoriasis inducida por Imiquimod

Descrito por primera vez en el 2009 (van der Fits et al., 2009), el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod en ratones se constituyó como un modelo ampliamente aceptado y utilizado debido a la inducción de un cuadro inflamatorio que presenta características fenotípicas similares a las encontradas en la psoriasis, incluyendo la modificación estructural de la piel, la infiltración de varios tipos de células inflamatorias, y la señalización asociada mayoritariamente al eje IL-23/IL-17. Basándose en las observaciones clínicas que indicaban que el uso de Imiquimod, un agonista del TLR7, podía inducir y exacerbar la psoriasis en pacientes, van der Fits estableció un modelo murino a partir de la aplicación tópica diaria de la crema Aldara (con 5% Imiquimod) en el lomo rasurado o en la oreja de los ratones. Se demostró que, hacia el tercer día de aplicación, la piel de los ratones empezaba a sufrir modificaciones estructurales parecidas a las encontradas en la psoriasis, como la acantosis, entendida como el engrosamiento de la epidermis como producto de la hiperproliferación de los queratinocitos, la descamación como indicadora de paraqueratosis, es decir de la alteración de diferenciación epidérmica, y el aumento del enrojecimiento de la piel o eritema. En estudios posteriores se demostró que la aplicación diaria del Imiquimod causaba la dilatación de los vasos sanguíneos de la piel y el aumento de células inflamatorias infiltrantes en el tejido. Con el mismo modelo, Terhorst et al., (2015) demostró que los neutrófilos, los monocitos y las células dendríticas derivadas de monocitos eran las primeras células en aumentar durante la fase temprana del desarrollo de las lesiones psoriásicas, mostrando un nivel máximo hacia el día 5 del tratamiento. Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual se da la infiltración de los neutrófilos en este modelo, se ha demostrado que la reducción de los neutrófilos infiltrantes se correlaciona con la disminución de la severidad de la psoriasis inducida por Imiquimod, así como con la disminución de la expresión de IL-1 β en la piel (Sumida et al., 2014).

Los efectos del Imiquimod son mediados por la activación de los TLR7 y 8 de macrófagos, monocitos y células dendríticas. Asimismo, se ha demostrado que el Imiquimod puede promover la expresión del TLR7 en queratinocitos, que normalmente lo expresan en niveles bajos (Li et al., 2013). Una vez estimulados, estos receptores inducen la expresión de citocinas proinflamatorias por una vía de señalización que depende de MyD88, TRAF-3/6, y de la activación de NF κ B, IRF-7 e IRF-5 (Petes, Odoardi, & Gee, 2017). Una vez establecida, la inflamación resultante por el uso del Imiquimod promueve la migración de células inflamatorias al tejido tratado, promoviendo la producción de

otras moléculas inflamatorias, entre las que se destaca la IL-23. A su vez, la IL-23 induce la expresión de otras citocinas proinflamatorias mediante la vía de STAT3, como IL-22, IFN γ , IL-17A e IL-17F, constituyendo el eje IL-23/IL-17 característico de enfermedades como la psoriasis o la dermatitis (Fig. 1.3).

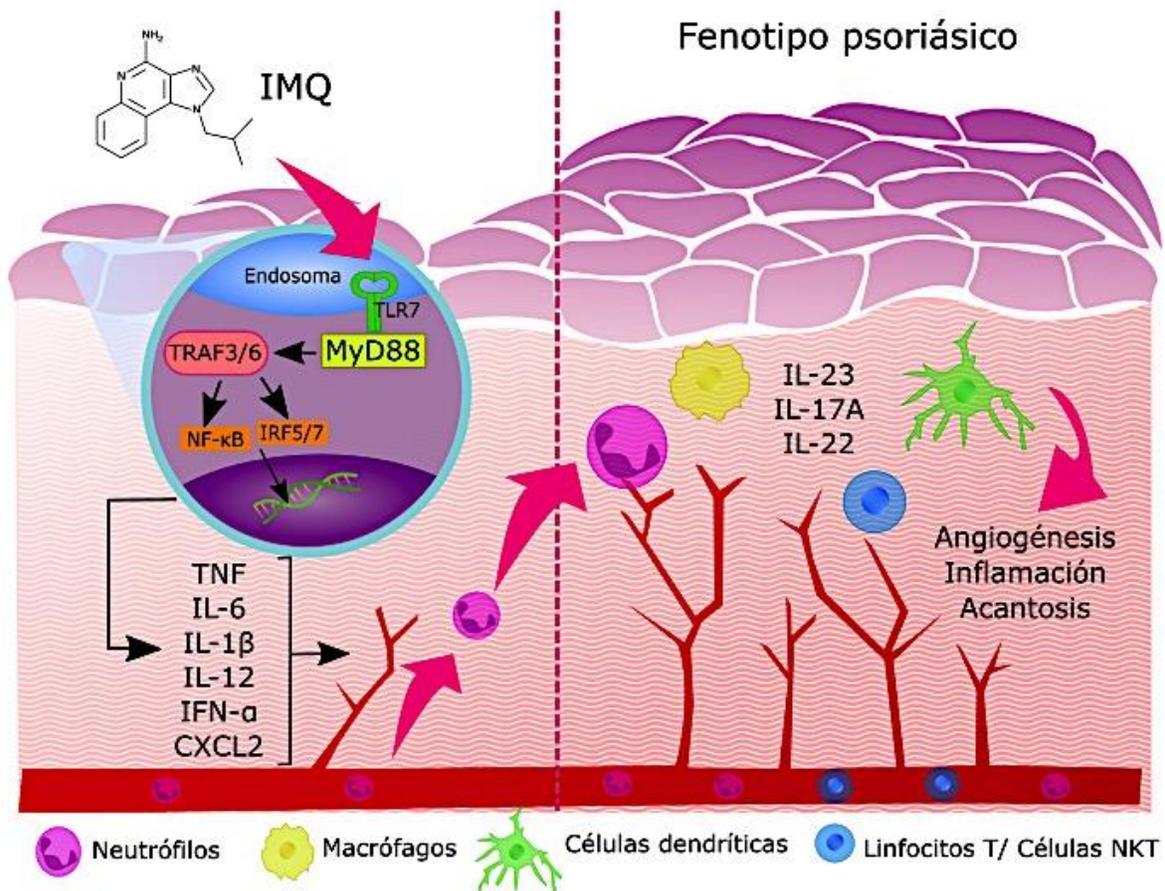


Figura 1.3. Señalización en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod. El Imiquimod, agonista del TLR7, se une a dicho receptor endosomal en macrófagos, monocitos, células dendríticas y queratinocitos. Por una vía de señalización dependiente de MyD88, TRAF3/6, NFκB e IRF5/7 se promueve la producción de citocinas proinflamatorias. Las citocinas estimulan la migración al tejido de células inflamatorias, como los neutrófilos, monocitos, linfocitos Th1, Th17 y NKT, las cuales a su vez producen más citocinas inflamatorias, especialmente del eje IL-23/IL-17. En conjunto, estas señales afectan la arquitectura de la piel, al propiciar la hiperproliferación de los queratinocitos y la angiogénesis (Li et al., 2013; Petes et al., 2017; van der Fits et al., 2009).

A lo largo del desarrollo del modelo, destacan dos picos de citocinas. Un primer pico de IL-23 que empieza 30 h después de la primera aplicación de Imiquimod, alcanzando un máximo a las 48 h, y un segundo pico en el que las citocinas predominantes son la IL-22, IL-17F, y la IL-17A cuya producción inicia desde las 30 h y se prolonga a todo lo largo de la duración del modelo, con un

máximo entre las 60 y 75 h (**Fig 1.4**). Así mismo, la señalización que ocurre en los queratinocitos es crucial para el desarrollo del fenotipo psoriásico en este modelo. En un estudio hecho por Moos, Mohebiany, Waisman, & Kurschus (2019), se demostró que cuando se quitaba el receptor IL-17RA en las células T o del linaje mieloide, no se afectaba el desarrollo de la enfermedad, mientras que si esto se hacía en los queratinocitos, el fenotipo de la enfermedad reducía significativamente. En este mismo trabajo se reportó la asociación de la deficiencia de la señalización por IL-17 con una disminución de neutrófilos infiltrantes en la piel, pero no de monocitos, los cuales mantuvieron sus niveles de infiltración en comparación a los controles.

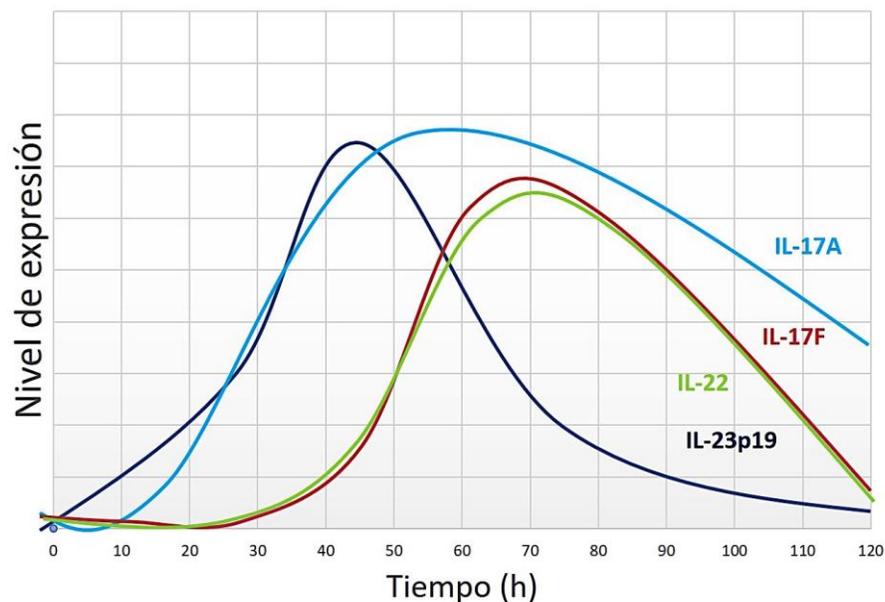


Figura 1.4. Cinética de expresión del mRNA de las citocinas del eje IL-23/IL-17 en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod en ratones. Se observa que el pico de IL-23p19 se da cerca de las 48 h después del inicio del tratamiento con Imiquimod. El aumento en la expresión de esta citocina es acompañado por el aumento de IL-17A, y el consecuente aumento de IL-17F y IL-22 hacia las 70 h. Adaptado de van der Fits et al. (2009).

1.6. Los péptidos de la piel de rana con propiedades inmunomoduladoras

La piel de los anfibios es un órgano en el que se llevan a cabo procesos de intercambio gaseoso y osmótico. Está equipada con glándulas mucosas que secretan compuestos que lubrican la piel, mantienen la humedad y le confieren permeabilidad. Además, cuenta con glándulas granulosas,

también conocidas como glándulas de veneno, que secretan compuestos que entre otras cosas sirven como defensa contra potenciales depredadores y patógenos. Por estas características, los péptidos aislados de la secreción cutánea de los anfibios han sido objeto de numerosos estudios farmacológicos que pretenden explotar las propiedades químicas y biológicas de estos compuestos para el tratamiento de múltiples enfermedades. Por lo general, estos péptidos son altamente eficientes al tener una selectividad elevada (Deslouches & Di, 2017; Erspamer et al., 1989; Fernandez, Gehman, & Separovic, 2009), lo que además disminuye los efectos secundarios que se puedan presentar durante su implementación terapéutica.

Entre las especies de anfibios que secretan compuestos biológicamente activos con potenciales propiedades farmacológicas, se encuentran las especies pertenecientes a la subfamilia de ranas arborícolas neotropicales *Phyllomedusinae*. Las ranas pertenecientes a esta familia producen varios tipos de péptidos con una amplia gama de funciones, como la inducción de la contracción del músculo liso y la secreción en el tracto gastrointestinal (filoceruleína y filolitorina), neuromoduladores (taquicininas), vasodilatadores (filoquinina), antidiuréticos (salvagina), antinociceptivos (dermorfina), antimicrobianos e inmunomoduladores (dermaseptinas) (Erspamer, Melchiorri, Falconieri Erspamer, Montecucchi, & de Castiglione, 1985).

Las dermaseptinas conforman una familia de pequeños péptidos catiónicos que al igual que muchos otros péptidos de defensa, tienen la capacidad de adoptar una conformación de hélice alfa anfipática cuando entran en contacto con las membranas celulares, insertándose en ellas. Con esto, se logra la formación de poros y la subsecuente desestabilización de la membrana, afectando la viabilidad celular (Amiche, M., Delfour, A. & Nicolas, P., 1999). Aunque la actividad antimicrobiana fue por mucho tiempo la principal función descrita para las dermaseptinas, algunos de los miembros de esta gran familia de péptidos también tienen propiedades inmunomoduladoras al afectar directamente la migración y supervivencia de las células inflamatorias (Auvynet et al., 2008) y angiostáticas (van Zoggel et al., 2012). En este trabajo, evaluamos la capacidad de inhibir la angiogénesis de un péptido aislado de la secreción cutánea de la rana *Pachymedusa dacnicolor* y que además posee propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. Un péptido con dichas características podría abrir el camino para el desarrollo de un fármaco de aplicación tópica para combatir enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis, sin necesidad de comprometer el tratamiento cuando el paciente adquiera alguna infección.

2. Antecedentes

En los estudios previos al presente trabajo, se aisló el péptido N a partir del exudado de piel de la rana *P. dacnicolor*, y se demostró que este péptido tenía un efecto antimicrobiano tanto en bacterias Gramnegativas como en bacterias Grampositivas de diferentes cepas multirresistentes (**Tabla 2.1**). Además, se encontró que el péptido N era citotóxico para las células inmunitarias de ratón y de humano, que era mucho menos citotóxico para otros tipos de células como las células epiteliales, y que no era hemolítico (**Fig 2.1**).

	CMI* (μM)	CMB* (μM)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	3.12	3.12
<i>Escherichia coli</i> ATCC ML35p	3.12	3.12
<i>Escherichia coli</i> P7 (BLSE)	1.5	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12.5	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27953	12.5	50
<i>Klebsiella oxytoca</i> CIP 7932	3.12	6.25
<i>Salmonella enterica</i> CIP 8297	12.5	25
<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 8297	3.12	12.5
<i>Vibrio parahemolyticus</i> IFREMER 01 01/252	>50	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3.12	3.12
<i>Staphylococcus aureus</i> ST 1065	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	25	>50
<i>Staphylococcus aureus</i> BM 3302	6.25	12.5
<i>Listeria monocytogenes</i> SOR 100	25	25
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP A186	50	>50
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	3.12	3.12
<i>Lactococcus garviae</i> ATCC 43921	25	50
<i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.65	6.25	6.25

Tabla 2.1. Actividad antimicrobiana del péptido N en diferentes cepas bacterianas. Se muestra la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del péptido N para diferentes cepas de bacterias.

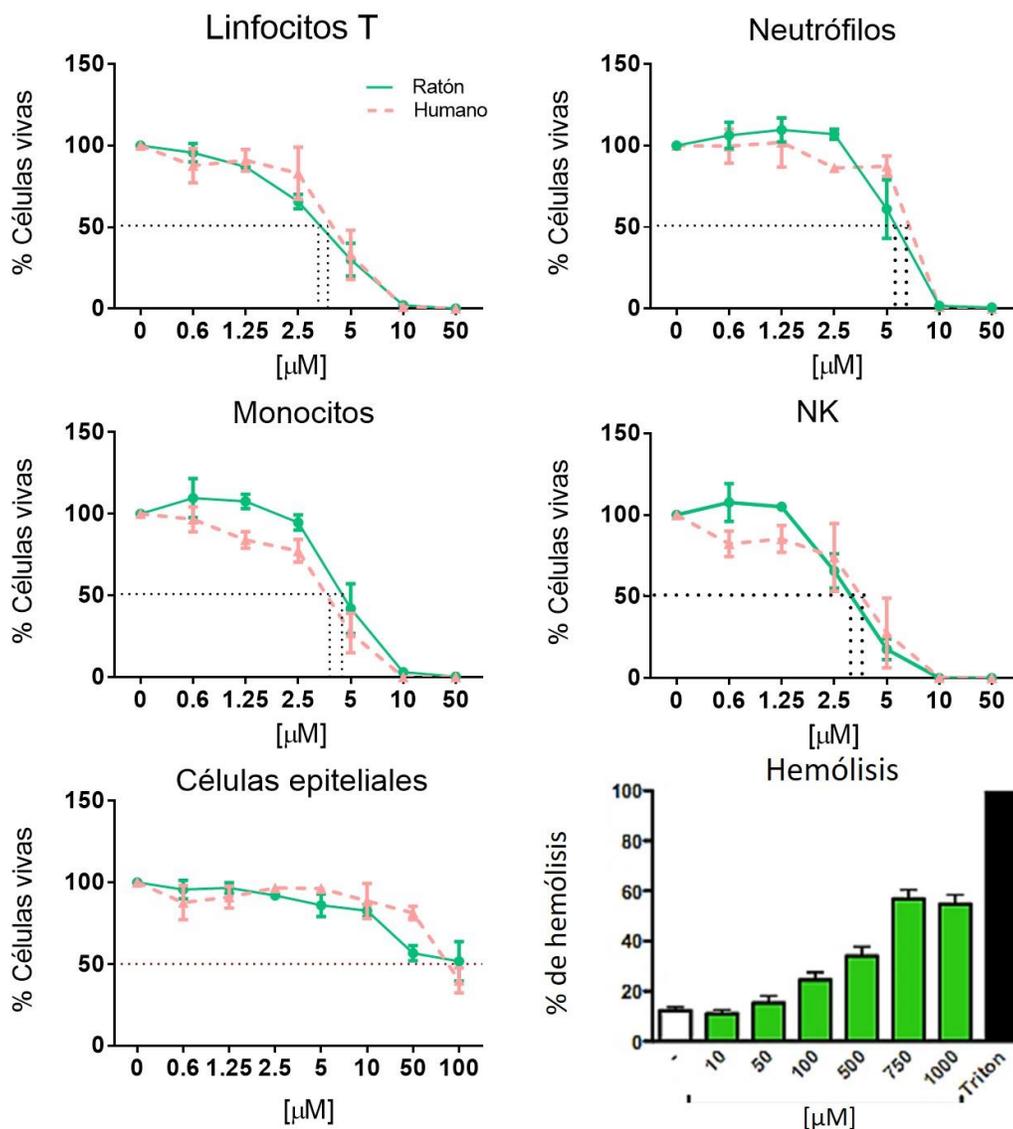


Figura 2.1. Citotoxicidad del péptido N sobre diferentes estirpes celulares. Viabilidad celular medida mediante citometría de flujo después de incubar las células en presencia del péptido N por dos horas. Se aislaron las células inmunitarias (linfocitos T, monocitos, neutrófilos y NK) de médula ósea de ratón o de sangre periférica de humano. Las células epiteliales se aislaron de tejido gástrico. La capacidad hemolítica se midió con eritrocitos de ratón (suspensión al 10% en PBS). Los resultados que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicados (resultados no publicados).

Por otra parte, a partir de análisis estructurales se determinó que el péptido N consistía básicamente en una hélice anfipática y catiónica, con una carga neta de +5 a pH 7. Además, un análisis de estructura-función de 20 mutantes del péptido N, permitió identificar dos variantes, K12A y Na (carboxiamidada) (**Tabla 2.2**), que mostraron tener una actividad semejante a la del péptido original sobre la viabilidad de células de médula ósea (**Fig 2.2**).

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Carga neta (pH 7)
N	XXXXX ⁵ XXXXX ¹⁰ XKXXX ¹⁵ XXXXX ²⁰ XXXXX ²⁵ XXXX	+5
K12A	XXXXX ⁵ XXXXX ¹⁰ XAXXX ¹⁵ XXXXX ²⁰ XXXXX ²⁵ XXXX	+4
Na	XXXXX ⁵ XXXXX ¹⁰ XKXXX ¹⁵ XXXXX ²⁰ XXXXX ²⁵ XXXX-NH ₂	+6

Tabla 2.2. Carga neta y cambios en la secuencia de aminoácidos de los péptidos N, Na y K12A. Se muestran los cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos de cada péptido y su correspondiente carga neta a pH 7.

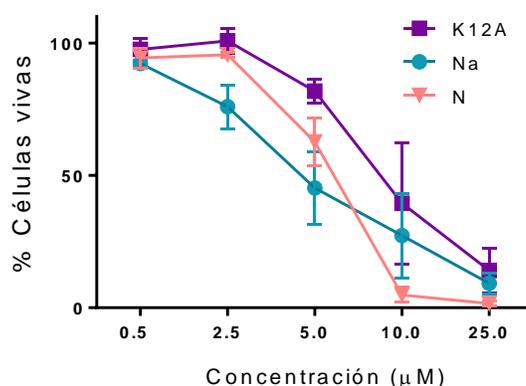


Figura 2.2. Efecto de los péptidos N, Na y K12A sobre la viabilidad de células de médula ósea de ratón. Resultados de viabilidad celular medida mediante tinción con azul tripano después de incubar las células por dos horas en presencia de los péptidos a diferentes concentraciones. Resultados de dos réplicas experimentales independientes realizadas por duplicado.

En conjunto, estos resultados indicaron que el péptido N y sus dos variantes, además de ser antimicrobianos, podrían actuar como inmunoreguladores al afectar directa y preferencialmente la viabilidad de las células inflamatorias. Con el propósito de determinar si estos péptidos tienen algún potencial para ser implementados en la farmacia, y considerando que la angiogénesis es un proceso

frecuentemente involucrado en un bucle de retroalimentación positiva con la inflamación y que desempeña un papel clave para el desarrollo de varias enfermedades inflamatorias, se planteó el presente proyecto para analizar más detalladamente el efecto de estos péptidos en el proceso de angiogénesis.

3. Hipótesis

El péptido N, aislado de la secreción cutánea de la rana *P. dacnicolor*, y sus variantes Na y K12A tienen propiedades anti-angiogénicas que podrían ser aprovechadas para su implementación terapéutica en el tratamiento de enfermedades que involucren un proceso angiogénico importante, además de un proceso inflamatorio.

4. Objetivo general

Caracterizar el efecto de los péptidos N, Na y K12A en el proceso de angiogénesis patológica.

5. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de los péptidos N, Na y K12A en el proceso de angiogénesis *ex vivo* e *in vitro*.
2. Determinar si los péptidos N, Na y K12A afectan la viabilidad de las células endoteliales y fibroblastos *in vitro*.
3. Validar los efectos en el proceso de angiogénesis de los péptidos N, Na y K12A *in vivo*, en el modelo de psoriasis en ratón inducida por Imiquimod.

6. Materiales y métodos

6.1. Síntesis de péptidos

La síntesis de los péptidos utilizados en este trabajo se llevó a cabo mediante un procedimiento químico *FastMoc* de fase sólida, en un sintetizador de péptidos automática Applied Biosystems 433° en el laboratorio de síntesis del Dr. Christophe Piesse, en la Universidad Pierre y Marie Curie, Francia. Los productos sintetizados se despegaron de la resina usando una mezcla de ácido trifluoroacético (94%), agua (2.5%), etilenglicol (2.5%), y triisopropilsilano (TIS) (1%). Posteriormente los péptidos se precipitaron en éter, se concentraron por centrifugación y se liofilizaron. Después, los péptidos se purificaron por HPLC (columna de fase reversa C18, módulo PrepLC 25mm, 250 mm x 10 mm, partícula de 15 mm) con una bomba de HPLC Waters 1252 binaria (tasa de flujo 8 mL min⁻¹). Los péptidos liofilizados se disolvieron en agua inyectable PiSA® para su utilización en los ensayos. Además de los tres péptidos N, Na y K12A, se sintetizó el péptido Scr cuya estructura primaria consiste en los mismos aminoácidos de la secuencia del péptido N, pero con un orden aleatorio.

6.2. Animales

Se usaron ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 8 a 18 semanas de edad, provenientes del bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron con suministro de agua y comida *ad libitum* y ciclos de luz/obscuridad 12/12, en un rack ventilado. En las secciones correspondientes se detalla el tratamiento y uso de los ratones. Todos los procedimientos realizados fueron avalados por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología.

6.3. Ensayos de angiogénesis con el modelo de anillos aórticos

Después de sacrificar a los ratones por dislocación cervical, se diseccionó la aorta de cada ratón y se lavó con PBS para remover los restos de sangre. Posteriormente ésta se cortó en segmentos de aproximadamente 0.5 mm de longitud. Cada segmento, o anillo, se embebió en una gota de Matrigel™ [Corning®, una preparación de membrana basal secretada por células de sarcoma murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) rica en laminina, colágeno IV, heparán sulfato, proteoglicanos,

entactina/nidogeno y varios factores de crecimiento] previamente colocada en un pozo de una placa de 24 pozos. La placa con los anillos aórticos se incubó por una hora a 37 °C, después de lo cual se agregó a cada pozo 1 mL de medio DMEM Advanced (Gibco®) suplementado con 10% de suero bovino (FBS:NBCS 1:1) a una concentración final de 15% de suero, 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Gibco®). Los anillos se incubaron a 37 °C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂ por dos días para que, usando los factores de crecimiento del Matrigel, las células endoteliales y los fibroblastos de los anillos pudieran empezar a formar los primordios de vasos. Al tercer día, se retiró el medio de cada pozo y se agregaron 500 µL de nuevo medio suplementado de la manera anteriormente descrita. Posteriormente, al cuarto o quinto día, dependiendo del crecimiento de la neovasculatura, el medio de cada pozo se suplementó con el tratamiento control (12.5 µL de agua inyectable) o bien con diferentes concentraciones (5 µM, 10 µM, 15 µM y 25 µM) de cada uno de los cuatro péptidos, en un volumen final de 500 µL. Cada día, hasta el cuarto día de incubación en presencia de los péptidos, se realizó el registro fotográfico de los anillos. El área de angiogénesis fue medida en cada imagen utilizando el software ImageJ 1.50i (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica de análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis, la cual puede ser considerada como una extensión de la prueba de Mann Whitney, y que sirve para comparar más de dos muestras independientes de igual o diferente tamaño, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Dunnet.

6.4. Cultivo y preparación de células

6.4.1. Células TeloHAEC

La línea de células endoteliales humanas TeloHAEC (ATCC® CRL-4052™) se adquirió del ATCC (“American Type Culture Collection”). Esta línea celular consiste en células endoteliales primarias provenientes de una aorta humana que fueron modificadas para expresar de manera estable la subunidad catalítica hTERT de la telomerasa con el propósito de alargar su vida media. Las células se cultivaron y se trataron con el medio basal para células vasculares (VCBM) (ATCC® PCS-100-030™) suplementado con el Kit-VEGF para células endoteliales (ATCC® PCS-100-041™), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las células se incubaron a 37 °C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cuando alcanzaron el 80-85% de confluencia, se les retiró el medio y se lavó con PBS.

Posteriormente se realizó el tratamiento con Tripsina-EDTA (0.125%) por 4 minutos a 37 °C, despegándolas y recolectándolas en medio VCBM suplementado, con lo que se obtuvo la suspensión celular necesaria para cada experimento y para seguir cultivando.

6.4.2. Fibroblastos NIH-3T3

Los fibroblastos embrionarios de ratón de la línea NIH-3T3 se cultivaron en cajas Petri (hasta máximo 15 pases) con medio DMEM Advanced (Gibco®) suplementado con 5% de suero bovino (FBS:NBCS 1:1), 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Gibco®) y se incubaron a 37 °C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 80-85% de confluencia se les retiró el medio y se lavó con PBS. Posteriormente se realizó el tratamiento con Tripsina-EDTA (0.25%) por 2 minutos a 37 °C, despegándolas y recolectándolas en medio DMEM suplementado, con lo que se obtuvo la suspensión celular necesaria para cada experimento, o se procedió a subcultivar las células.

6.4.3. Fibroblastos humanos

Los fibroblastos aislados de piel humana de individuos sanos y con psoriasis fueron proporcionados por la Dra. Laura Bonifaz de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las células se mantuvieron en cultivo con medio DMEM bajo en glucosa, suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS:NBCS 1:1), 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Gibco®) a 37 °C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Para obtener la suspensión celular necesaria para los experimentos se siguió el mismo procedimiento descrito para los fibroblastos NIH-3T3.

6.4.4. HaCaT

Las células de esta línea de queratinocitos de piel humana (Boukamp et al., 1988), fueron proporcionados por la Dra. Laura Bonifaz de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las células se cultivaron en cajas Petri (hasta máximo 15 pases) con medio DMEM Advanced (Gibco®) suplementado con 5% de suero bovino (FBS: NBCS 1:1), 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Gibco®) y se incubaron a 37 °C, atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia se les retiró el medio y se lavó con PBS. A continuación, se realizó un primer lavado con

Tripsina-EDTA (0.25%) la cual se recolectó inmediatamente, y posteriormente se realizó un segundo tratamiento con Tripsina-EDTA (0.25%) por 5 minutos a 37 °C despegando las células y recolectándolas en medio DMEM suplementado, con lo que se obtuvo la suspensión celular necesaria para cada experimento, o se procedió a subcultivar las células.

6.5. Ensayos de muerte celular

6.5.1. Azul tripano

El azul tripano es un compuesto derivado de la toluidina, no puede atravesar la membrana de una célula viva, sin embargo, puede ser absorbido por las células muertas que tienen comprometida la integridad de su membrana. Para evaluar el efecto de los péptidos sobre la viabilidad de las distintas estirpes celulares, se utilizaron placas de 48 pozos. En cada pozo se sembraron aproximadamente 500,000 células TeloHAEC en un volumen final de 200 µL de medio VCBM suplementado con diferentes concentraciones de los péptidos (0.5 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM y 25 µM). Para el control negativo se utilizaron 200 µL de una solución de medio y agua inyectable al 25%, y para el control positivo de muerte celular, se utilizaron 200 µL de una solución de DMSO al 30% en PBS. Las células fueron incubadas por dos horas en presencia de los péptidos. Posteriormente se procedió a hacer el conteo de las células vivas y muertas mediante una cámara de Neubauer realizando una dilución 1:2 de la muestra con la solución de azul tripano en un volumen final de 20 µL.

6.5.2. Cristal violeta

La tinción de células adherentes con cristal violeta se utiliza comúnmente como una medida indirecta de la muerte celular de células adherentes, ya que, al morir, las células pierden su adherencia a la placa. Este método es fácil y confiable para monitorear el efecto citotóxico de numerosos fármacos.

En cada pozo de una caja de 96 pozos se sembraron células a una densidad de 15,000 células/pozo, en un volumen final de 100 µL de medio DMEM o VCBM suplementado (para los fibroblastos y las células endoteliales, respectivamente). La placa se dejó en incubación a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 a 48 h para permitir que llegaran a confluencia. Posteriormente, se retiró el medio de cada pozo y se agregaron 100 µL de nuevo medio suplementado con diferentes concentraciones de los

péptidos (0.5 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 25 μ M). Para el control negativo se utilizaron 100 μ L de una solución de medio y agua inyectable al 25%, y para el control positivo de muerte celular, se utilizaron 100 μ L de una solución de DMSO al 30% en PBS. Después de dos h de incubación a 37 °C, se retiró el medio y se procedió a lavar cada pozo con 250 μ L de PBS para retirar el medio y las células despegadas remanentes. A continuación, se tiñó con 50 μ L/pozo de una solución de cristal violeta al 0.5% en metanol (0.5 g de cristal violeta diluidos en 80 mL de agua y 20 mL de metanol) y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 20 minutos (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Después de retirar la solución de cristal violeta se lavó dos veces con agua miliQ (300 μ L/pozo). Se dejó secar la placa por 16 h, después de lo cual se agregaron 200 μ L de metanol para solubilizar el cristal violeta y se procedió a leer la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas. Por cada tratamiento se hicieron triplicados y por cada control se realizaron seis réplicas. El experimento se hizo un total de tres veces.

El porcentaje de células vivas se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células vivas} = \frac{\text{abs 570 nm de pozo tratado con péptido} * 100}{\text{abs 570 nm de pozo control negativo de muerte}}$$

6.5.3. Citometría de flujo

En una placa de 24 pozos, se sembró en cada pozo una densidad de 50,000 células/pozo, en un volumen final de 500 μ L de medio DMEM suplementado. Las placas con las células fueron incubadas a 37 °C y 5% CO₂ por dos días, tiempo en el que llegaron a confluencia. Posteriormente, se procedió a realizar el tratamiento con los péptidos a diferentes concentraciones (0.5 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M, 10.0 μ M, 15.0 μ M y 25.0 μ M) para lo que se retiró el medio de cada pozo y se pusieron 500 μ L de nuevo medio con los péptidos a las diferentes concentraciones indicadas con anterioridad. Para el control negativo se utilizó una solución de agua inyectable al 25% en medio, y como control positivo de muerte celular se usó DMSO al 30% en PBS. Las células fueron entonces incubadas por dos horas en presencia del péptido, tiempo después del cual se retiró el medio de cada pozo y se lavó con 500 μ L de PBS, y se agregaron 150 μ L de Tripsina-EDTA 0.25% (Sigma®) para despegar las células. Todo el líquido recuperado de cada pozo después del tratamiento con los péptidos (medio y PBS utilizado para los lavados) fue recolectado en el mismo tubo con el propósito de no perder las células muertas producto del tratamiento con los péptidos. A continuación, se lavó con 2 mL de PBS centrifugando

a 478 xg por 10 minutos y se procedió a hacer la tinción con el colorante eBioscience™ Fixable Viability Dye eFlour 780™, un compuesto que penetra en las células que tienen comprometida la integridad de la membrana, a una dilución final de 1: 10,000 en un volumen de 500 µL, incubando a 4 °C, protegido de la luz por 30 minutos, para después lavar con 2 mL de PBS. El botón celular se resuspendió y fijó con 200 µL de PFA 2%. La adquisición de los eventos celulares se llevó a cabo en un citómetro de flujo BD FACSCanto II y su posterior análisis se hizo utilizando el software FlowJo v 10 (la estrategia de gating se puede encontrar en el **Anexo 6.1**). Para el análisis estadístico de todos los experimentos de viabilidad se utilizó la prueba no paramétrica de análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Dunnet.

6.6. Ensayo de formación de tubos

En una placa de 96 pozos se colocaron en cada pozo 40 µL de Matrigel y se pre-incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, en cada pozo, se sembraron 15,000 a 20,000 células, las cuales se incubaron por seis horas en presencia de los diferentes péptidos a una concentración de 15 µM. En otra modalidad del experimento, las células se incubaron primero por seis horas en ausencia de los péptidos, y a al término de este tiempo se agregaron los péptidos a 15 µM, incubando las células por dos horas más. El análisis de los resultados para ambos casos se realizó mediante el registro fotográfico y su subsecuente procesamiento utilizando el software ImageJ y el plugin “Angiogenesis Analyzer” desarrollado por Gilles Carpentier (Carpentier et al., 2012) (**Fig 6.1**). Se consideraron cuatro parámetros principales: número de nodos, número de extremos sueltos, número de uniones y área total de la red, cada uno de los cuales fue estimado como porcentaje con respecto al tratamiento control. Adicionalmente, se calculó un índice de angiogénesis definido mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{número de nodos} + \text{número de uniones} + \text{área total de la red} - \text{número de extremos}}{100}$$

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica de análisis de varianza de una vía de Mann Whitney que sirve para comparar dos muestras independientes de igual o diferente tamaño.

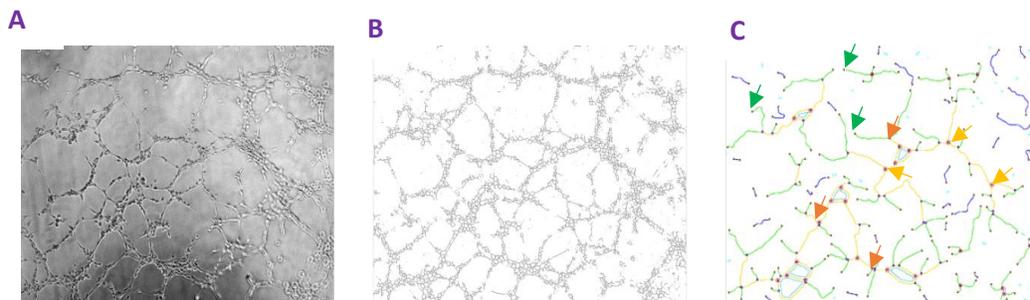


Figura 6.1. Procesamiento de imágenes con el plug in “Angiogenesis Analyzer” de ImageJ.

Se ilustra el proceso de análisis de imágenes para la medición de los parámetros de angiogénesis. A) El programa parte de una imagen de microscopía en contraste de fases en donde se encuentren los tubos formados por las células endoteliales seis horas después de ser sembradas en Matrigel. B) Se genera un árbol que esquematiza la red de tubos encontrada. C) Se realiza la medición de los parámetros básicos: número de nodos (flechas amarillas), número de extremos (flechas verdes) y número de uniones (flechas naranjas).

6.7. Ensayo *in vivo* de psoriasis inducida por Imiquimod

6.7.1. Inducción de psoriasis en ratones

El protocolo experimental descrito a continuación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El protocolo que se siguió fue el propuesto por van der Fits et al., (2009), el cual consiste en rasurar el lomo de los ratones BALB/c de ambos sexos, y de entre 12 y 14 semanas de edad, seguida de la aplicación de crema depiladora. A partir del día siguiente, se inició la aplicación tópica en la zona depilada de 62.5 mg de la crema Aldara™, la cual contiene 5% de Imiquimod, cada 24 h, durante seis días. Al séptimo día se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical, para la disección de la piel y demás órganos necesarios para los análisis competentes. Se registró el peso corporal y del bazo, se tomaron fotografías de la piel, se extrajo sangre y se diseccionó la piel, la médula ósea y bazo para el análisis de las poblaciones celulares inflamatorias mediante citometría de flujo. Además, al término del experimento se tomaron medidas del grosor de la piel del lomo de los ratones utilizando un calibrador Vernier digital.

En el experimento se consideraron seis grupos experimentales: 1) control negativo de la enfermedad, 2) control positivo de la enfermedad (Imiquimod), 3) control vehicular del péptido, 4)

péptido N, 5) péptido Scr, y 6) Clobetasol como tratamiento de referencia de la psoriasis (Feldman & Yentzer, 2009). La aplicación de los péptidos (10 µg de péptido/24 h) se hizo de manera tópica, en el lomo de los ratones, usando como vehículo 62.5 mg de crema blanca elaborada a base de petrolato blanco y que demostró ser inocua por sí sola (**Anexo 6.2.**), una hora después de haber aplicado el Imiquimod (**Tabla 6.1**). Para cada grupo experimental se utilizaron de tres a cuatro ratones por grupo.

Grupo experimental	Clave	Imiquimod	Tratamiento (1 h después del Imiquimod)
1) Control negativo	–	–	NADA
2) Control positivo	+	✓	NADA
3) Control vehicular de los péptidos	Veh	✓	Vehículo (crema blanca)
4) Péptido N	N	✓	péptido N en vehículo
5) Péptido Scr	Scr	✓	péptido Scr en vehículo
6) Clobetasol	Clob	✓	Clobetasol (crema al 0.05%)

Tabla 6.1. Descripción de cada grupo experimental usado en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod. Se detallan los grupos experimentales, la designación de cada grupo (clave) utilizada a lo largo de todo el documento y la descripción del tratamiento con los péptidos o Clobetasol de cada grupo experimental.

6.7.2. Citometría de flujo

Las muestras de médula ósea, sangre y bazo fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las muestras fueron previamente tratadas con buffer de lisis para eritrocitos (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃ y 0.1 mM EDTA) y teñidas para Ly6G, CD11b, CD3, CD4 y CD8 (**Anexo 6.3**). Para realizar los conteos celulares se utilizaron perlas de 3 µm de diámetro a una concentración de 10,000 perlas por tubo de citometría, y se contabilizaron 5,000 perlas por muestra. Las células se pasaron por un citómetro de flujo FACSCanto II, se adquirieron con el software BD FACSDiva™ (BD Biosciences, Oxford, UK) y analizadas con el software FlowJo v. 10 (Tree Star, Ashland, OR).

6.7.3. Ensayo de Multiplex

Este ensayo se utilizó para medir los niveles de citocinas inflamatorias producidas en la sangre y en la piel de los ratones tratados. Para ello, se recolectó el suero de la sangre extraída de los ratones, y se cultivaron explantes de la piel de los ratones por siete horas en 500 μ L de medio de cultivo RPMI, recuperando los sobrenadantes de cultivo. Se utilizó el kit LEGENDplex™ de Biolegend® (Cat. No. 740150), el cual reconoce 12 proteínas asociadas directamente a inflamación: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- β , IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF, y se procedió en base a las instrucciones del fabricante (**Anexo 8.3**).

6.7.4. Análisis de vascularización de la piel y estimación de índice de psoriasis

Para analizar la vascularización de la piel se realizó el registro fotográfico de la cara interna de la piel de los ratones tratados. Posteriormente, las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ con el plugin de “Vessel Analysis” (Elfarnawany, 2016), el cual permitió medir el área total de vascularización en la piel y el diámetro de los vasos (**Fig 6.2**).

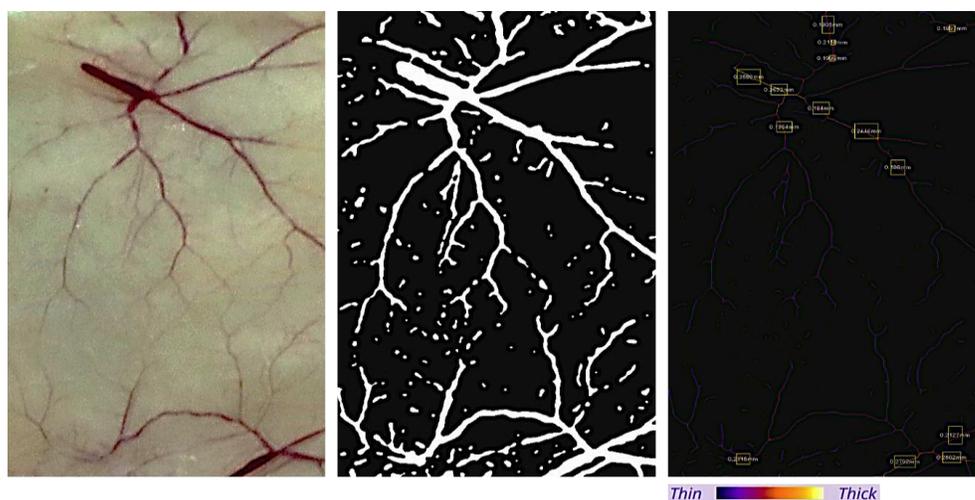


Figura 6.2. Cuantificación de los principales parámetros de vascularización. Sucesión de imágenes generadas por el plug in “Vessel Analysis” del programa ImageJ, en el panel izquierdo la imagen original, en el panel central la imagen generada para la cuantificación del área de vascularización y hacia la derecha la imagen generada para la estimación del diámetro vascular.

Para la estimación del índice de psoriasis se realizó la evaluación de la gravedad de las lesiones psoriásicas por el método de doble ciego considerando tres parámetros: eritema, placas y grosor de

la piel (van der Fits et al., 2009). Cada uno de los parámetros se calificó con un puntaje en la escala del cero al cuatro, siendo el 0 equivalente al control sano y 4 el mayor en cuanto a severidad. El índice de psoriasis fue calculado sumando los puntajes promedios para el eritema, las placas y, según el caso, el grosor de la piel.

El análisis estadístico de los datos consistió en la prueba LSD de Fisher no corregida como prueba de comparación múltiple. Con base en estos resultados se agruparon los tratamientos experimentales en grupos abcd. Si se desea saber si existe una diferencia significativa entre dos tratamientos basta con ver si comparten alguna letra (a, b, c o d). Si es así, ha de suponerse que no existen diferencias estadísticas entre estos grupos, por el contrario, si no comparten ninguna letra es porque sí existe una diferencia significativa. La tabla de valores p para cada comparación se encuentra referenciada en la sección de anexos para cada caso.

6.7.5. Histología de piel

La piel del lomo de los ratones tratados se fijó en formalina el día del sacrificio y posteriormente se embebió en parafina para la realización de los cortes para histología. Se realizaron cortes transversales de la piel con 5 μm de grosor. Posteriormente se procedió a hacer la tinción con hematoxilina y eosina. Las imágenes de los cortes fueron adquiridas mediante un microscopio óptico Nikon® ECLIPSE E600 y una cámara Nikon® DS-F.

7. Resultados

7.1. El péptido N y sus variantes Na y K12A inhiben el proceso de angiogénesis *ex vivo* de manera dependiente de dosis.

El ensayo de los anillos aórticos se utiliza para estudiar el proceso de angiogénesis y consiste básicamente en cultivar explantes de aortas sobre un extracto de membrana basal para promover la migración y proliferación de las células endoteliales de los anillos. De esta manera, el área que ocupan las células endoteliales provenientes de la aorta representa una aproximación cuantitativa del efecto de cualquier sustancia en el proceso de angiogénesis.

Como primera medida y con el objetivo de determinar si los péptidos tenían algún efecto en la angiogénesis se utilizó el ensayo de anillos aórticos como modelo experimental para evaluar el efecto de los péptidos N, Na y K12A a diferentes concentraciones. Se observó que el área de angiogénesis de los anillos, conformada por las células endoteliales que migran en el Matrigel, disminuyó significativamente en presencia de los péptidos (**Fig 7.1, panel superior**). Los resultados obtenidos indican que, a las dos concentraciones más elevadas (15 μM y 25 μM), los péptidos N, Na y K12A inhiben por completo el crecimiento del área de angiogénesis en los anillos aórticos (**Fig 7.1, panel inferior**). A la concentración de 10 μM , este efecto, aunque estadísticamente significativo, fue menos marcado para los tres péptidos, y a una concentración de 5 μM o menor (**Anexo 7.1**) no se observó un efecto significativo en ninguno de los casos. Llama la atención que para el caso del péptido K12A, a una concentración de 15 μM , el efecto inhibitorio en la angiogénesis no sea tan marcado como en los demás péptidos a esta misma concentración. Como era de esperarse, el péptido Scr, que se utilizó como control al ser una molécula con la misma composición de aminoácidos que los péptidos originales, pero en un orden aleatorio y que en consecuencia no tiene la estructura original, no mostró efecto alguno sobre la angiogénesis en el ensayo de anillos aórticos, a ninguna de las concentraciones probadas. Esto indica que el efecto anti-angiogénico de los péptidos N, Na y K12A en realidad depende de su estructura y no es el resultado inespecífico de la adición de cualquier molécula semejante a las mismas concentraciones en el medio de cultivo.

En conjunto, estos resultados indican que los tres péptidos probados N, Na y K12A, tienen un efecto inhibitorio en la formación de la microvasculatura desde una concentración de 10 μM en adelante.

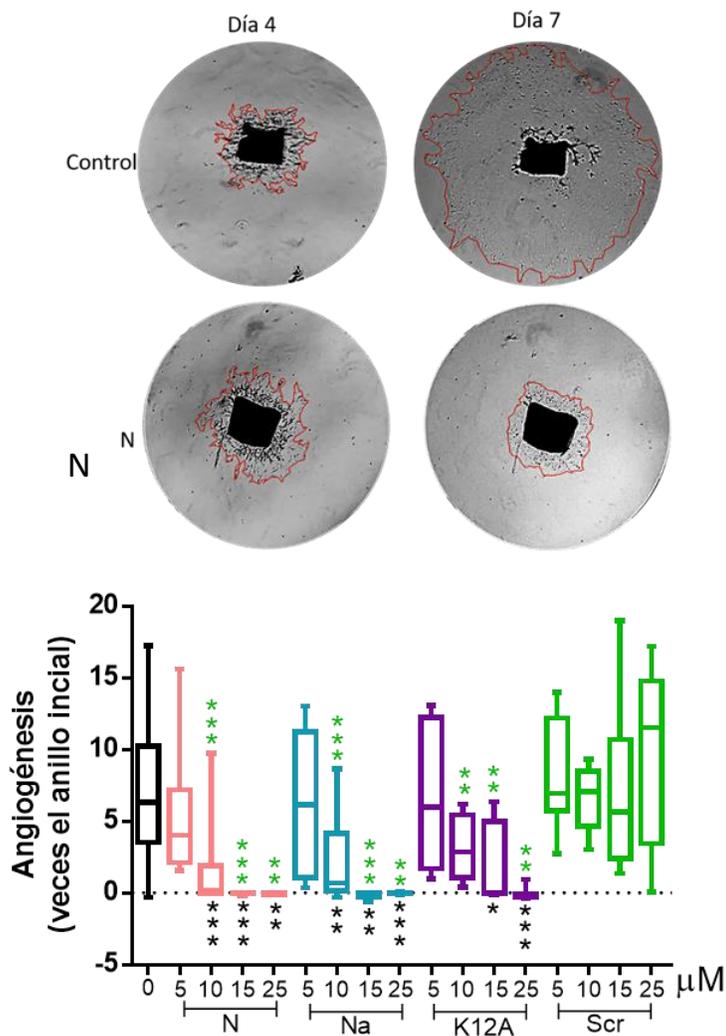


Figura 7.1. Área de angiogénesis al día 4 después del tratamiento con los péptidos a diferentes concentraciones. *Panel superior:* fotografía de un anillo aórtico control y con el tratamiento del péptido N a 25 μM al día 4 (día de inicio del tratamiento con el péptido) y al día 7 (día final del tratamiento). *Panel inferior:* resultados de la prueba de múltiples comparaciones de Dunnett, después de haber realizado el análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis (** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$) (0 = control). Los asteriscos negros indican diferencia estadística con respecto al control y los verdes con respecto al péptido Scr. Para cada tratamiento se analizaron de 8 a 15 anillos.

7.2. El péptido N y sus variantes Na y K12A afectan la viabilidad de los fibroblastos y en menor medida la de las células endoteliales *in vitro*.

Para caracterizar mejor el efecto inhibitorio de la angiogénesis por parte de los péptidos, fue necesario evaluar en qué medida se afectaban los principales componentes celulares de la aorta importantes en la angiogénesis (células endoteliales, fibroblastos y células inflamatorias). Para realizar estos experimentos se seleccionó la técnica de cristal violeta, la cual resultó ser la más adecuada para medir el número de células viables remanentes en cada pozo, después del tratamiento con distintas concentraciones de cada uno de los péptidos.

Considerando que las células endoteliales son las principales células involucradas en el proceso de angiogénesis se procedió a evaluar el efecto de los péptidos en la viabilidad celular de la línea TeloHAEC ATCC®. Los resultados (**Fig 7.2 A**) indicaron que los péptidos afectaron la viabilidad de las células endoteliales, pero la disminución en la viabilidad celular no superó en ningún caso el 50% en el rango de concentraciones probadas (0.5 μ M a 25 μ M), contrario a los datos presentados en la sección de **antecedentes** para los leucocitos. Cabe resaltar que los péptidos Na y K12A afectaron significativamente la viabilidad de las células TeloHAEC cuando se aplicaron desde una concentración de 10 μ M, mientras que el péptido N logró el mismo efecto desde la concentración de 15 μ M.

El tejido elástico de la aorta es producido principalmente por los fibroblastos. Además, los fibroblastos desempeñan un papel muy importante en la angiogénesis al secretar el factor de crecimiento fibroblástico y proveer el soporte necesario para la estabilización de los nuevos vasos sanguíneos (Nakatsu et al., 2003). Para evaluar el efecto de los péptidos sobre este linaje celular se empleó la línea de fibroblastos embrionarios de ratón NIH-3T3 (**Fig 7.2. B**), y se observó que el péptido Na tuvo un efecto citotóxico significativo desde una concentración de 2.5 μ M, mientras que los péptidos N y K12A afectaron significativamente la viabilidad celular al aplicarse desde una concentración de 10 μ M. A esta misma concentración, el tratamiento con el péptido Na alcanzó su máximo nivel de citotoxicidad en las células (aproximadamente 75%), mientras que los péptidos N y K12A sólo generaron cerca del 40% de muerte celular. A la mayor concentración (25 μ M), los tres péptidos produjeron la muerte de más del 75% de las células NIH-3T3. De igual forma, el

efecto citotóxico de los péptidos sobre los fibroblastos embrionarios de ratón se corroboró por citometría de flujo (**Anexo 7.2**).

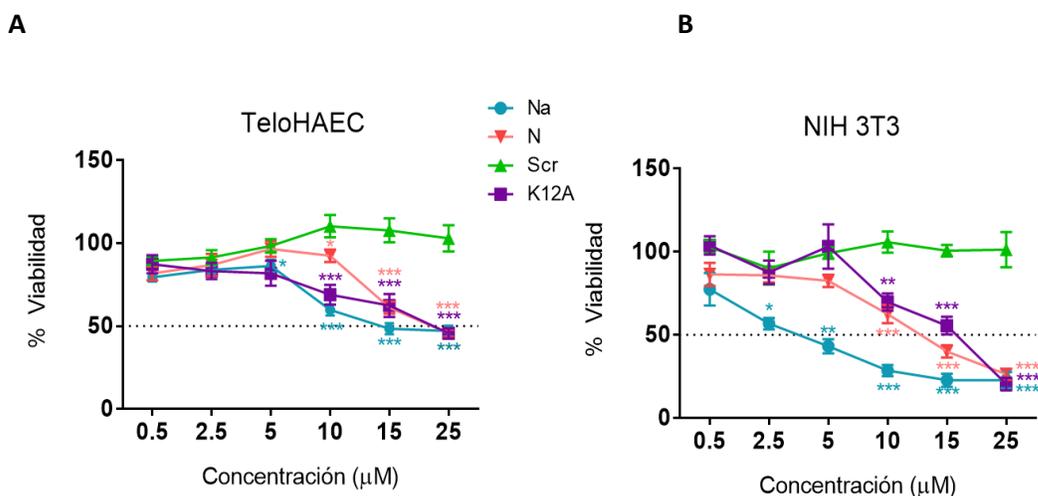


Figura 7.2. Viabilidad celular medida después de dos horas de incubación con los péptidos. Ensayos de viabilidad con cristal violeta. Prueba de múltiples comparaciones de Dunnett (** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$). Los asteriscos indican diferencia estadística con respecto al Scr. Se muestran los resultados de tres réplicas experimentales independientes, cada una con tres pozos por cada concentración.

Si se comparan los resultados obtenidos para ambos tipos celulares evaluados, se puede evidenciar que los péptidos inducen la muerte celular de los fibroblastos de manera más severa que en las células endoteliales. Mientras que en éstas últimas el nivel máximo de citotoxicidad de los péptidos alcanzó cerca del 50%, para los fibroblastos este mismo valor fue cerca del 75%. Estos resultados sugieren que, en condiciones de cultivo equivalentes (células adheridas a una superficie de plástico, formando una monocapa), los fibroblastos son más sensibles al efecto citotóxico de los péptidos que las células endoteliales.

7.3. Ninguno de los péptidos afecta la estructura de la red tubular una vez establecida.

Al ser cultivadas, las células endoteliales mantienen su potencial para iniciar un proceso angiogénico si se les proporcionan los factores necesarios (DeCicco-Skinner et al., 2014). Cuando se siembran sobre un extracto de matriz de membrana basal como el Matrigel y se suplementan con los factores de crecimiento necesarios, logran diferenciarse morfológicamente y formar

estructuras semejantes a los capilares sanguíneos que consisten en tubos con un lumen (Lawley & Kubota, 1989). El ensayo de formación de tubos con células endoteliales es muy útil para evaluar la efectividad de drogas que afecten el proceso de angiogénesis, ya que los efectos observados bajo estas condiciones a menudo reproducen lo que sucede *in vivo*.

Con el propósito de evaluar el efecto de los péptidos sobre las células endoteliales cuando presentan una morfología más parecida a la que adoptarían *in vivo*, es decir, formando estructuras tubulares que se asemejan a los capilares, se utilizó el ensayo de formación de tubos sobre Matrigel (DeCicco-Skinner et al., 2014). Las células endoteliales TeloHAEC se sembraron sobre el Matrigel y se incubaron durante seis horas, tiempo al cual ya habían establecido la red tubular. A continuación, se agregaron los péptidos a una concentración de 15 μM y las células se incubaron por dos horas más para evaluar si los péptidos podían afectar la red tubular una vez establecida. Bajo estas condiciones experimentales, para ninguno de los parámetros considerados se observaron diferencias marcadas entre los tratamientos con los péptidos y el tratamiento control (**Fig 7.3**), indicando que ninguno de los péptidos N, Na y K12A afecta a los tubos, una vez formados. De igual forma, el índice de angiogénesis que considera los cuatro parámetros evaluados muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y los demás tratamientos con los péptidos.

Estos resultados indican que ninguno de los péptidos evaluados afecta a las células endoteliales cuando se encuentran organizadas en túbulos.

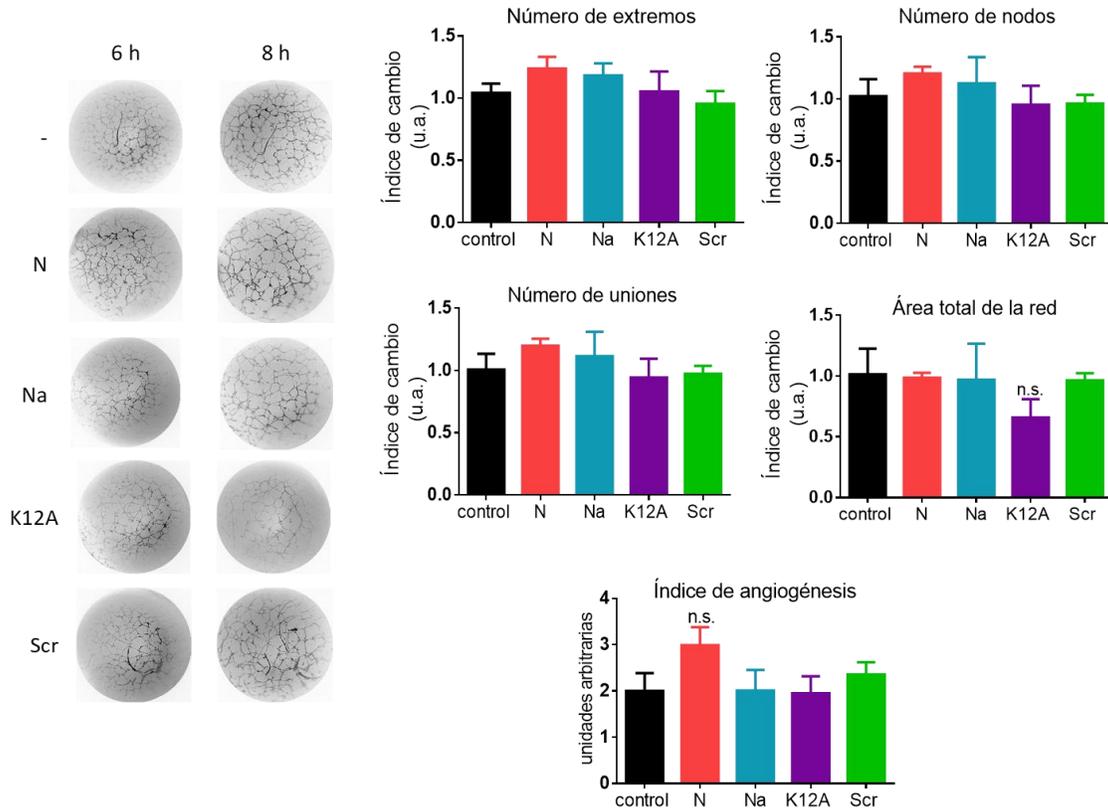


Figura 7.3. Una vez formada, la red vascular no se altera por la adición de los péptidos evaluados. Las células endoteliales TeloHAEC se sembraron sobre el Matrigel y se incubaron a 37 °C por seis horas, tiempo al cual se agregaron los péptidos a una concentración de 15 μ M. En el panel izquierdo se muestra el registro fotográfico que se realizó antes de agregar los péptidos (6 h) y después de dos horas (8 h) de haberlos agregado. En el panel derecho se muestra la cuantificación de los parámetros de angiogénesis. Se indica la diferencia estadística con respecto al control. Prueba de Mann-Whitney. (** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, n.s. = no significativo) ($n = 6$). Se muestran los resultados de dos réplicas experimentales independientes con tres pozos por tratamiento.

7.4. El péptido Na, mas no los péptidos N y K12A, inhibe la formación de tubos por las células endoteliales.

Los resultados descritos en la sección anterior que indicaron que los péptidos no afectan la viabilidad de las células endoteliales cuando ya están organizadas en tubos se contraponen con los resultados obtenidos con los ensayos de angiogénesis con anillos aórticos mostrados en la **Fig.7.1** en los que, en mayor o menor medida, los tres péptidos afectaron considerablemente el proceso de angiogénesis. Además de ser modelos experimentales de angiogénesis claramente distintos,

la otra diferencia entre los experimentos mostrados en las **Fig 7.1 y 7.3** estriba en el momento en el que se adicionan los péptidos. En el modelo de anillos aórticos, los péptidos se agregaron desde el inicio del experimento, mientras que en el experimento de formación de tubos con las células TeloHAEC descrito en la **Fig. 7.3**, los péptidos se añadieron una vez establecida la red de tubos. En función de estas diferencias, se realizó un ensayo de formación de tubos con las células endoteliales TeloHAEC, adicionando los péptidos al mismo tiempo que las células se sembraron en los pozos recubiertos de Matrigel.

El análisis de las imágenes de los pozos en los que se agregó el péptido Na, pero no donde se agregó el péptido N, el péptido K12A, o el vehículo de los péptidos, mostró una inhibición de la formación de tubos por las células TeloHAEC (**Fig 7.4**). Las imágenes de los pozos tratados con el péptido Na evidenciaron la presencia de segmentos truncos que no se interconectaban los unos con los otros para formar una retícula, a diferencia de lo que se observó con los otros péptidos (**Fig 7.4, panel izquierdo**). Los parámetros medidos, resumidos en el índice de angiogénesis (número de extremos, número de nodos, número de uniones y área total de la red) demostraron una tendencia clara que indicaba la falta de una red tubular en los pozos tratados con el péptido Na, pero no en los pozos tratados con los péptidos N, K12A o Scr (**Fig 7.4 panel derecho**).

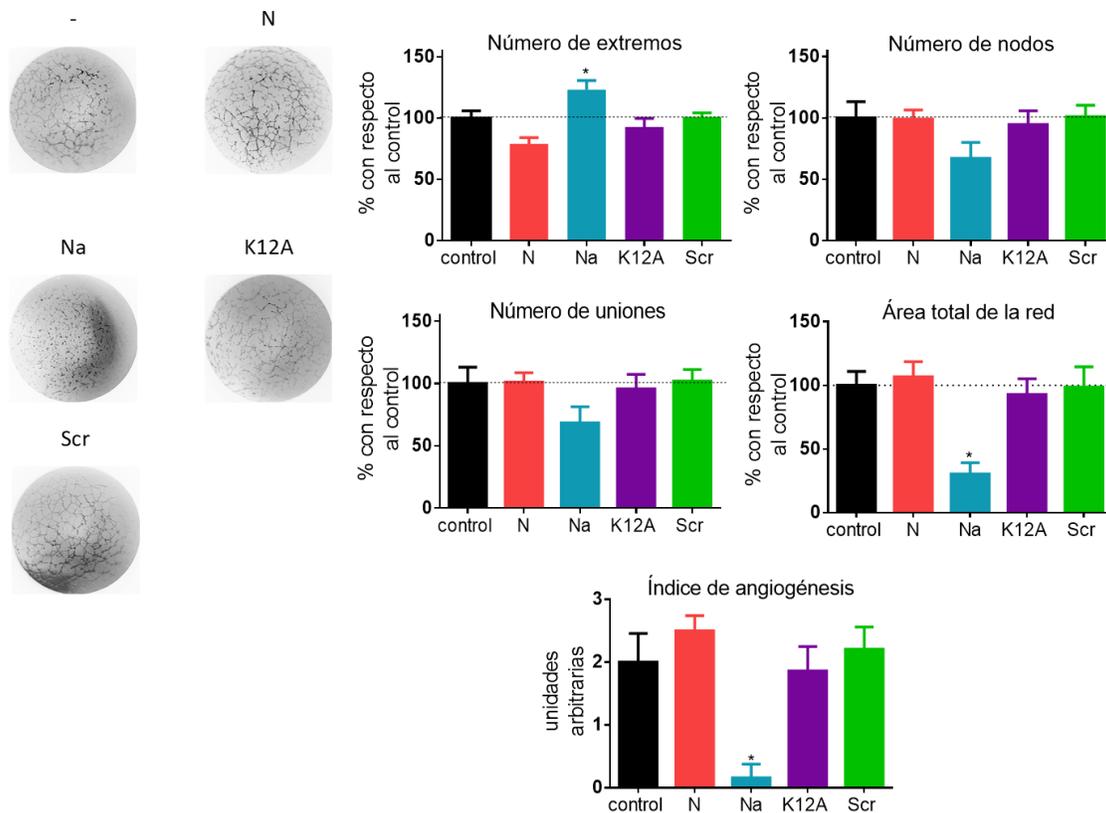


Figura 7.4. A excepción del péptido Na, ninguno de los péptidos inhibe la formación de tubos. Las células endoteliales TeloHAEC fueron sembradas sobre el Matrigel en presencia de los péptidos evaluados a una concentración de 15 μ M. En el panel izquierdo se muestran las fotografías que se tomaron a las seis horas de incubación. Las estrellas negras indican significancia estadística con respecto al control. En el panel derecho la cuantificación de los parámetros de angiogénesis. Prueba de Mann-Whitney. (** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, n.s.= no significativo)) (n=9). Se muestran los resultados de tres réplicas experimentales independientes con tres pozos por réplica y por concentración.

Considerando que los datos mostrados en la **Fig 7.4** se obtuvieron agregando los péptidos a las células endoteliales en suspensión al momento de ser sembradas, se decidió evaluar la viabilidad de las células TeloHAEC en suspensión en presencia de los péptidos a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos (**Fig 7.5.**) indicaron que sólo el péptido Na afectó sustancialmente la viabilidad de las células endoteliales a una concentración de 15 μ M, mientras que a 25 μ M los tres péptidos son citotóxicos. Así, este experimento, en conjunto con los resultados obtenidos en el ensayo de formación de tubos indica que el efecto del péptido Na en la formación de tubos se

debe a la inducción de la muerte de las células endoteliales al momento en que éstas todavía se encuentran en suspensión sobre el Matrigel.

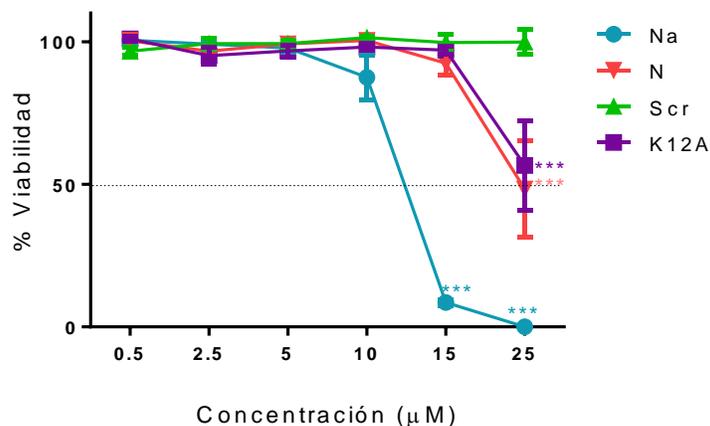


Figura 7.5. Los péptidos son citotóxicos para las células TeloHAEC en suspensión. Las células endoteliales TeloHAEC en suspensión se incubaron por dos horas en presencia de los péptidos a diferentes concentraciones. Se muestran los resultados de viabilidad medida a partir de la tinción con azul tripano. Se indica la diferencia estadística con respecto al Scr. Prueba de Mann-Whitney. (***) $p < 0.0001$, (**) $p < 0.001$, (*) $p < 0.01$, n.s.= no significativo) (n=4). Resultados de dos experimentos independientes con 2 pozos por concentración.

En conjunto, estos resultados indican que, en un contexto unicelular, en el que sólo hay células endoteliales, los péptidos N y K12A tienen poca o nula capacidad de afectar la formación de tubos a concentraciones de hasta 15 μM , a diferencia del péptido Na. Si bien el péptido Na afecta la viabilidad de las células TeloHAEC en suspensión a esta concentración, no induce la muerte de éstas cuando se encuentran formando tubos, un estado que asemeja las condiciones *in vivo*. Por tanto, es posible concluir que el mecanismo por el cual los péptidos inhiben la angiogénesis no es precisamente afectando la viabilidad de las células endoteliales.

7.5. Aplicación del péptido N en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod en ratón.

Para validar los resultados anti-angiogénicos y antiinflamatorios observados *in vitro* y *ex vivo*, se probó el efecto del péptido N *in vivo*, con el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod, un agonista del TLR7. Se utilizó este péptido porque mostró tener un efecto anti-angiogénico *ex vivo*

y ser menos citotóxico para las células endoteliales en comparación con el péptido Na, una consideración importante en la medida en que se desconocía el efecto que tendría la aplicación del péptido en un organismo vivo.

La aplicación del Imiquimod induce inflamación, producción de citocinas y quimiocinas que promueven la neovascularización y el desarrollo de placas psoriásicas en la piel de los ratones (van der Fits et al., 2009). Como se mencionó en la **introducción**, a lo largo del proceso inflamatorio que se desarrolla en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod, existe una dinámica en los niveles de citocinas que dirigen el desarrollo del fenotipo de la enfermedad. Considerando esta cinética para evaluar la capacidad del péptido N de aminorar el desarrollo de placas psoriásicas, la neovascularización y la reacción inflamatoria, se realizó la aplicación tópica diaria del mismo iniciando a dos tiempos distintos después de la primera aplicación del Imiquimod: 30 h y 48 h (**Fig 7.6**). Para estos experimentos se empleó Clobetasol como referente, un corticosteroide que se utiliza como tratamiento para la psoriasis (Feldman & Yentzer, 2009), aplicándolo diariamente desde las 48 h después del inicio del tratamiento con el Imiquimod.

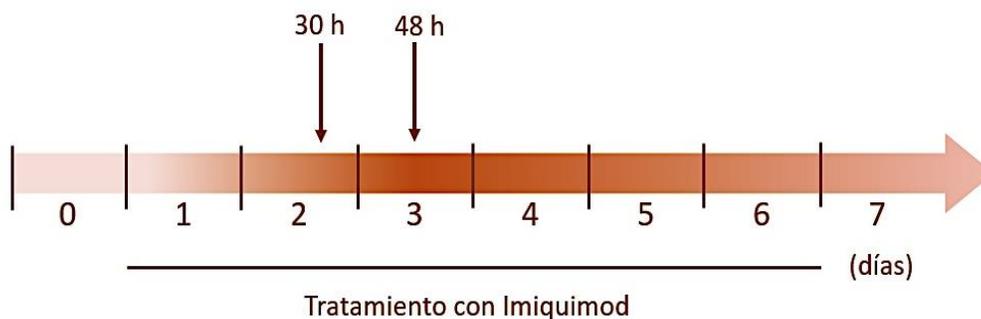


Figura 7.6. Esquema de tratamiento de los ratones con Imiquimod. Las flechas indican los tiempos del inicio de aplicación del péptido N. La aplicación del péptido se realizó cada 24 h a partir de la primera aplicación. El tratamiento con Imiquimod se realizó durante seis días consecutivos.

7.5.1. Efecto del péptido N en la estructura de la piel e infiltrado celular.

La aplicación tópica del Imiquimod sobre la piel de los ratones afectó visiblemente la integridad del tejido. En los animales tratados únicamente con Imiquimod (control +), el primer cambio que se evidenció durante los seis días de tratamiento fue el enrojecimiento de la piel a partir del tercer día después de haber iniciado la aplicación del Imiquimod, día en el que se presenta el pico de citocinas proinflamatorias (Sumida et al., 2014). Hacia el quinto día, se empezaron a desarrollar

las placas psoriásicas y lesiones semejantes, y en algunos casos se observaron pequeñas placas localizadas, parecidas a heridas abiertas. Al realizar la evaluación visual de las pieles el día del sacrificio de los ratones, se pudo observar el desarrollo del fenotipo de la psoriasis en los controles positivos, junto con el enrojecimiento y las placas psoriásicas características (**Fig 7.7 A**). Las pieles de los controles negativos, a los cuales sólo se les rasuró el pelo, mantuvieron su coloración normal, sin lesiones.

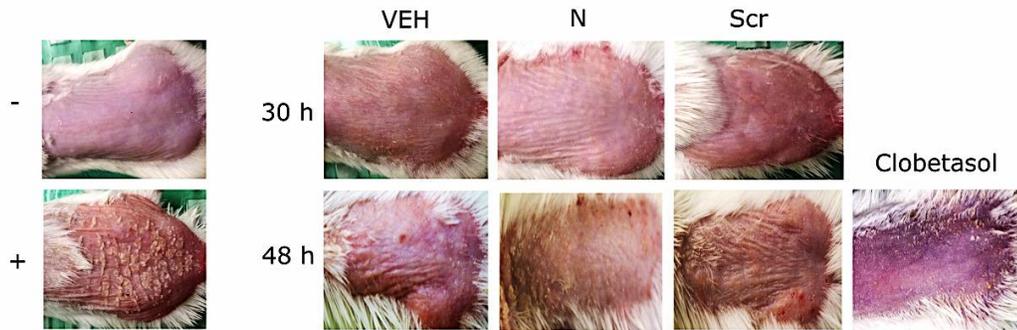
El enrojecimiento de la piel en respuesta a los diferentes tratamientos no demostró una tendencia evidente para ninguno de los casos. Si bien los controles negativos y positivos se pudieron diferenciar claramente en cuanto al grado de eritema, todas las pieles que fueron tratadas con Imiquimod demostraron niveles de eritema comparables (**Fig 7.7 B**).

En cuanto a las placas psoriásicas, en el tiempo 30 h, en los grupos Veh, N y Scr hubo menos placas que en el grupo control +. En el tiempo 48 h, en los ratones tratados con el péptido Scr la apariencia de las placas fue comparable a la del grupo control +, pero en aquellos tratados con el péptido N o con el vehículo hubo menos placas psoriásicas.

El grosor de la piel, el cual sólo se midió en el experimento en el que los péptidos se aplicaron desde las 30 h después de haber iniciado el tratamiento con Imiquimod, tendió a disminuir en los grupos Veh, N y Scr, comparado con el grupo control + (**Fig 7.7**). En general, la piel de los ratones tratados con el vehículo (grupos Veh, N y Scr), lucía más hidratada que la de los controles tratados únicamente con Imiquimod (grupo +). El efecto emoliente del vehículo se puede observar en las gráficas de puntaje acumulado de las 30 y 48 h, aunque tendió a disminuir cuando el tratamiento empezó 48 h después de la primera aplicación de Imiquimod.

El índice de psoriasis para ambos casos (30 h y 48 h) ubicó al control vehicular, a los tratamientos con los péptidos y al Clobetasol entre los controles positivo y negativo (**Fig 7.7 B**). Entre todos, el control vehicular tuvo mayor variabilidad entre ambos tiempos de aplicación en cuanto a este índice, presentando menores niveles que los péptidos cuando fue aplicado desde las 30 h, y mayores que los mismos cuando fue aplicado desde las 48 h.

A



B

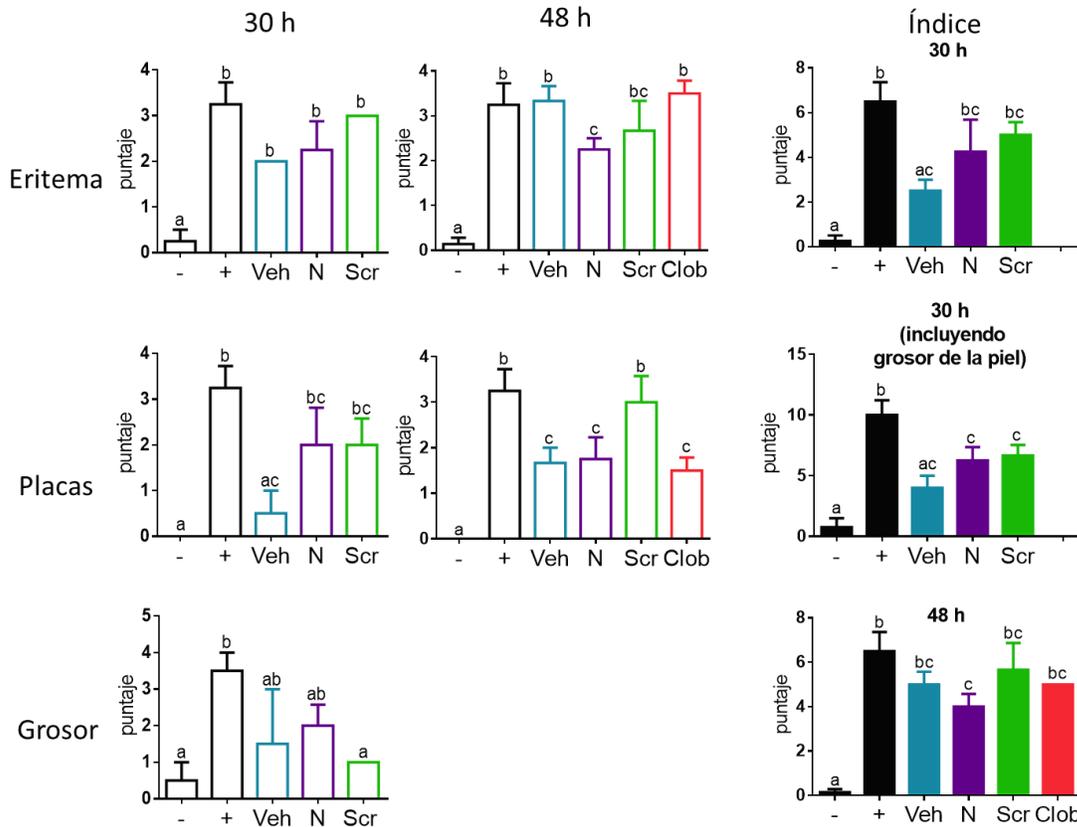


Figura 7.7. Efecto del péptido N sobre la severidad de la psoriasis inducida por Imiquimod. A) Imagen representativa de la apariencia macroscópica de la piel de los ratones con los tratamientos indicados. B). *Panel izquierdo*, puntaje de los parámetros evaluados a las 30 y 48 h después del inicio del tratamiento con Imiquimod. *Panel derecho*, índice de severidad de las lesiones a las 48 h (mínimo cuatro ratones por grupo) y 30 h (con y sin grosor de la piel) (tres a cuatro ratones por grupo). Los grupos *abcd* fueron designados según la prueba de múltiples comparaciones usando el método LSD de Fisher no corregido, la matriz de valores p puede encontrarse en el **Anexo 7.3**. (-, control negativo; +, control positivo, sólo Imiquimod; Veh, Imiquimod + control vehicular del péptido; N, Imiquimod + péptido N; Scr, Imiquimod + péptido Scr).

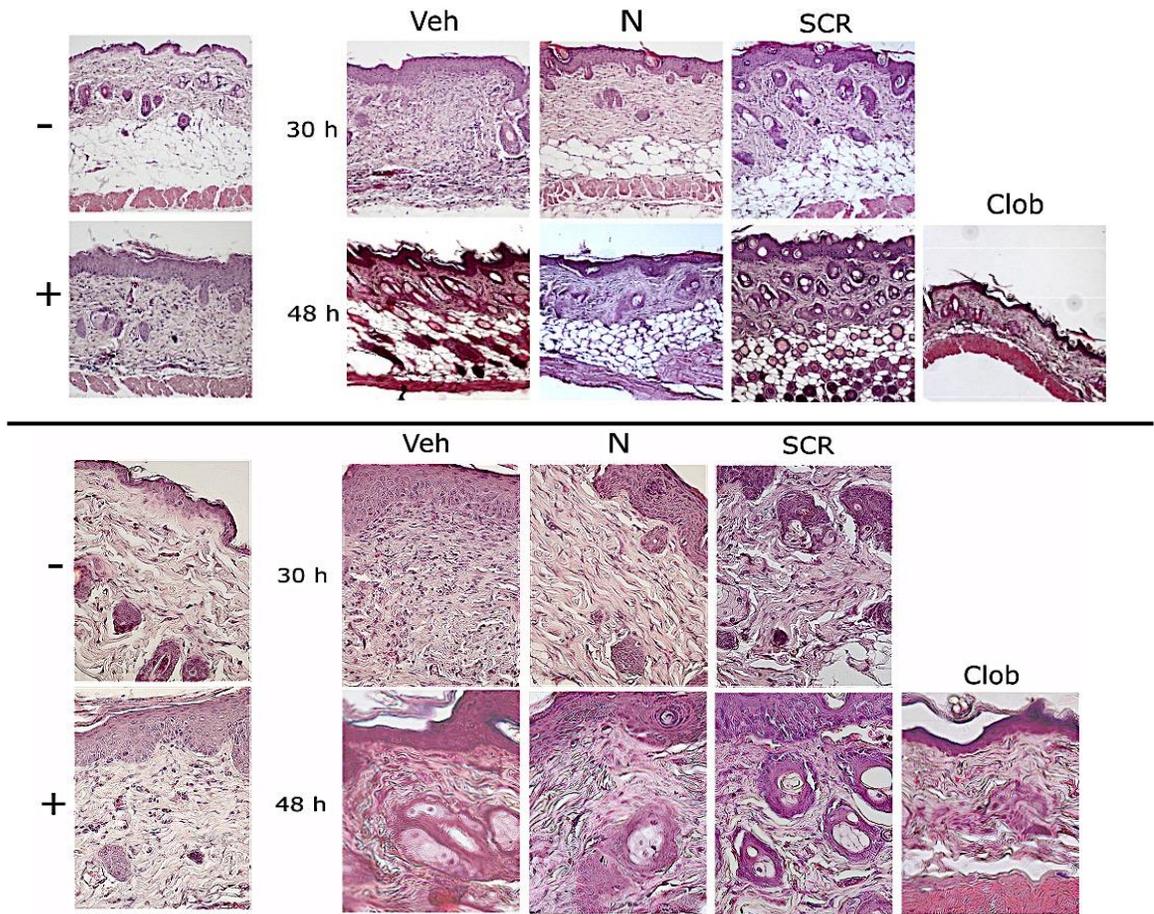


Figura 7.8. Efecto de la aplicación del péptido N en la histología de la piel. Cortes histológicos de las pieles de los animales tratados y teñidas con hematoxilina y eosina. *Panel superior:* se muestran las imágenes con un aumento de 10X. *Panel inferior:* se muestra el mismo campo con un objetivo de 40X. (-, control negativo; +, control positivo, sólo Imiquimod; **Veh**, Imiquimod + control vehicular del péptido; **N**, Imiquimod + péptido N; **Scr**, Imiquimod + péptido Scr).

Al realizar el análisis de los cortes histológicos de las pieles de los ratones se evidenciaron importantes cambios en la estructura tisular de los controles positivos en comparación a los controles sanos (**Fig 7.8**). En primer lugar, la acantosis, entendida como el engrosamiento de la epidermis, fue muy marcada en los controles positivos, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para este modelo. En segundo lugar, en la dermis de los controles tratados con Imiquimod se observó mayor infiltrado inflamatorio. De igual forma, en la piel de los ratones tratados con el control vehicular se observaron altos niveles de infiltrado en la dermis, el cual fue más conspicuo cuando se inició la aplicación desde las 30 h. En cambio, el tratamiento con el péptido N desde las 30 h disminuyó considerablemente el infiltrado celular en la dermis. Aunque

el tratamiento con el péptido N no impidió el engrosamiento de la epidermis inducido por el Imiquimod, la apariencia de la dermis se asemejó más a la del control sano (ratones -). El tratamiento con el péptido Scr, tanto desde las 30 como desde las 48 h, mostró acantosis e infiltrado inflamatorio comparable al de los ratones del grupo control positivo. El Clobetasol por su parte disminuyó considerablemente la acantosis, presentando un grosor de la epidermis muy similar al control sano, al igual que un menor nivel de infiltrado leucocitario, pero abundantes vasos sanguíneos, en concordancia con el grado de eritema observado.

En conjunto, estos resultados indican que, a diferencia del péptido Scr y a pesar de que el vehículo de los péptidos por si solo tiene un cierto efecto emoliente, el péptido N disminuyó la inflamación por el Imiquimod, y que aplicarlo 30 h después de la primera dosis de Imiquimod es mejor que aplicarlo 48 h después de la primera dosis de Imiquimod. Además de mejorar la piel en términos de eritema y de placas psoriásicas, se observó menor infiltrado inflamatorio en la dermis. Es importante remarcar que la sola aplicación del vehículo del péptido (crema blanca) es suficiente para disminuir visiblemente la formación de placas psoriásicas, sin embargo, dicho tratamiento no logra disminuir el infiltrado celular en la dermis. Finalmente, el Clobetasol, aunque inhibe la formación de las placas psoriásicas, no tiene un efecto significativo en el enrojecimiento de la piel, lo que se refleja en el puntaje para el eritema y la alta frecuencia de vasos sanguíneos observados en la histología.

7.5.2. Efecto del péptido N en la angiogénesis in vivo.

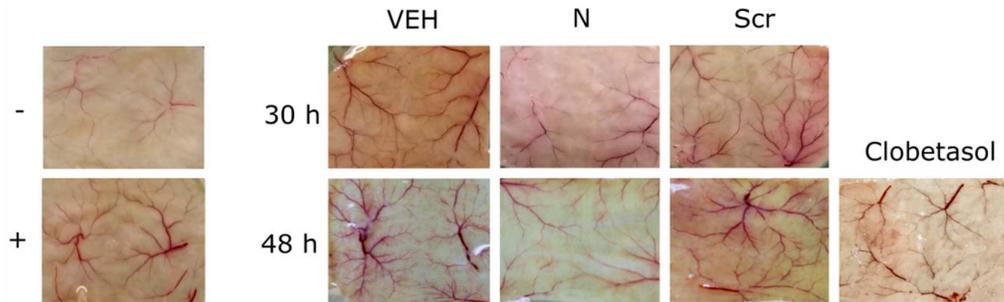
La angiogénesis participa de manera importante en el desarrollo de las lesiones psoriásicas. En el modelo de psoriasis inducido por Imiquimod, este agonista del TLR7 induce la producción de VEGF, un potente agente angiogénico, por parte de las células de la epidermis y del endotelio vascular (Wu, Xie, Zhao, Liu, & Luo, 2016). Para evaluar el nivel de angiogénesis resultante de los distintos tratamientos se consideraron tres parámetros básicos para el análisis de la cara interna de la piel de los ratones: 1) el diámetro promedio de los vasos sanguíneos, 2) el diámetro mayor alcanzado por los vasos, y 3) la densidad vascular. Con estos tres elementos, se calculó el índice (puntaje acumulado) de angiogénesis.

La piel de los ratones tratados con Imiquimod (control positivo) mostró una vascularización prominente, comparada con la de los controles sanos. La densidad vascular que se observó en respuesta a la aplicación del péptido N a las 30 o 48 h, se mantuvo al nivel del control negativo, mientras que la densidad vascular en la piel de los ratones tratados con Imiquimod y el vehículo del péptido o el péptido Scr fue significativamente más elevada. Asimismo, el diámetro promedio de los vasos de la piel de los ratones tratados con el péptido N desde las 30 h después de iniciado el tratamiento con Imiquimod fue menor que el de la piel de los ratones tratados con el vehículo, aunque cuando se aplicó el péptido a las 48 h, se vio un engrosamiento vascular semejante al del tratamiento con el vehículo (**Fig 7.9**).

El puntaje acumulado de los diferentes parámetros evidenció el efecto anti-angiogénico del péptido N cuando éste se aplicó a las 30 h, mostrando valores muy similares al control negativo y diferenciándose claramente del control positivo y el tratamiento con el péptido Scr. Por otro lado, la aplicación del péptido N a las 48 h de haber iniciado el tratamiento no fue efectiva, pues no logró diferenciarse ni del vehículo, ni del tratamiento con el péptido Scr. Por su lado, el Clobetasol no logró evitar la angiogénesis como resultado del tratamiento con el Imiquimod (**Fig.7.9**).

Estos resultados indican que el péptido N tiene capacidad anti-angiogénica al ser aplicado tópicamente en la piel de los ratones tratados con Imiquimod, recapitulando los resultados obtenidos *ex vivo* con los ensayos de angiogénesis con anillos aórticos, e *in vitro*, con los ensayos de formación de tubos con las células TeloHAEC. La aplicación del péptido desde las 30 h de haber iniciado el tratamiento con Imiquimod fue suficiente para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos, mientras que la aplicación del mismo a las 48 h resultó sólo en una tendencia a disminuir la densidad vascular que no logró ser estadísticamente significativa.

A



B

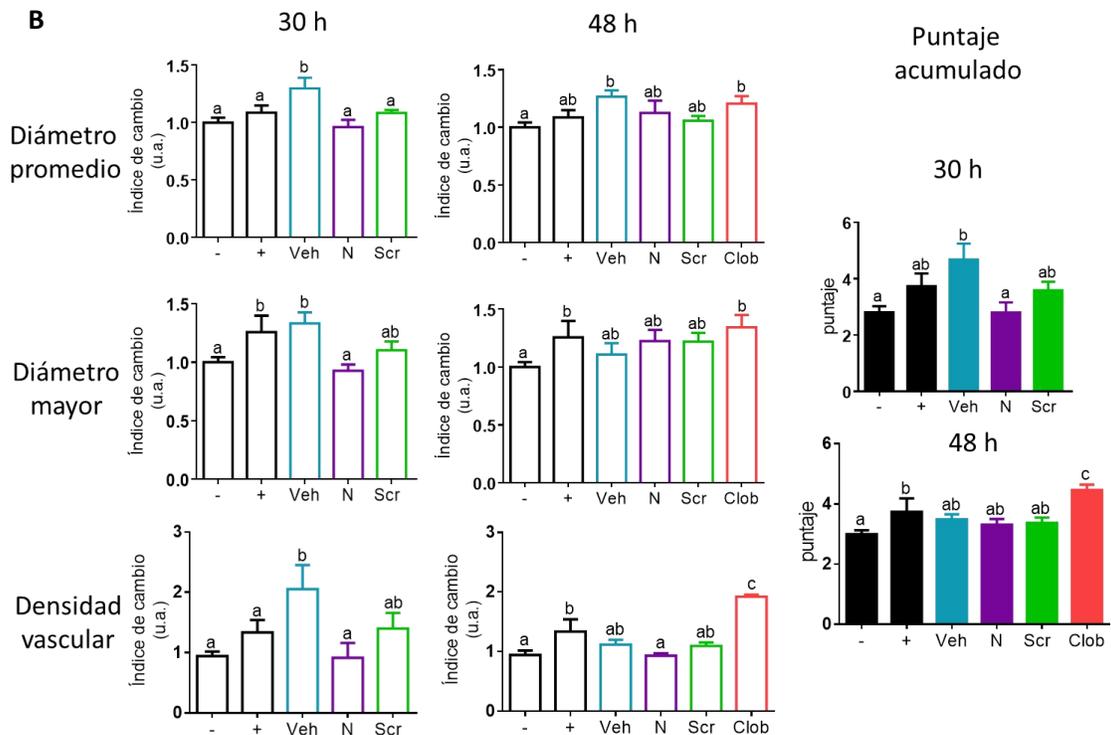


Figura 7.9. Diferencias en la vascularización entre los distintos tratamientos experimentales. A) Fotografías de la cara interna de la piel de los ratones al séptimo día después del inicio del tratamiento con Imiquimod. B) Cuantificación de parámetros de vascularización. Los grupos *abcd* se designaron según la prueba de múltiples comparaciones usando el método LSD de Fisher no corregido, la matriz de valores p puede encontrarse en el **Anexo 7.4**. (n=4). (-, control negativo; +, control positivo, solo Imiquimod; **VEH**, Imiquimod + control vehicular del péptido; **N**, Imiquimod + péptido N; **Scr**, Imiquimod + péptido Scr).

El péptido N tiene un efecto diferencial en las poblaciones de células inflamatorias dependiendo de su tiempo de aplicación.

Para tener una idea del efecto sistémico que tendría la aplicación del péptido N en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod se evaluaron los niveles de células inflamatorias en la médula ósea, el bazo y la sangre de los ratones, en el momento del sacrificio. La tendencia general entre los controles negativos y positivos fue el aumento generalizado de neutrófilos y monocitos en la sangre y bazo de los ratones tratados con Imiquimod (**Fig 7.10**). Por otro lado, los linfocitos CD4 y CD8 mostraron una tendencia a disminuir en la sangre y a aumentar en el bazo con el tratamiento con Imiquimod.

Cuando la aplicación del péptido N inició desde las 30 h después de la primera administración de Imiquimod, los niveles de neutrófilos y de linfocitos T en sangre disminuyeron y el número de células mieloides CD11b+ Ly6G- fue muy semejante entre grupos. En cambio, cuando la aplicación empezó 48 h después de iniciado el tratamiento de Imiquimod, se registró un mayor número de neutrófilos en sangre y una importante disminución de esta población en médula ósea (sugiriendo una migración de neutrófilos de la médula ósea a la sangre), mientras que los niveles de linfocitos T fueron comparables a los de los controles tratados con Imiquimod. Asimismo, en este grupo, la cantidad de células mieloides CD11b+ Ly6G- es mayor en los ratones tratados con el vehículo de los péptidos, el péptido N o Scr que en los ratones tratados sólo con Imiquimod o Clobetasol, reflejando probablemente un efecto del vehículo.

En el bazo, se encontró un comportamiento más homogéneo entre todos aquellos tratamientos en los que se administró Imiquimod. El grupo tratado con Clobetasol, resultó ser similar al control negativo, tanto en la cantidad de las células inflamatorias como en sus proporciones relativas.

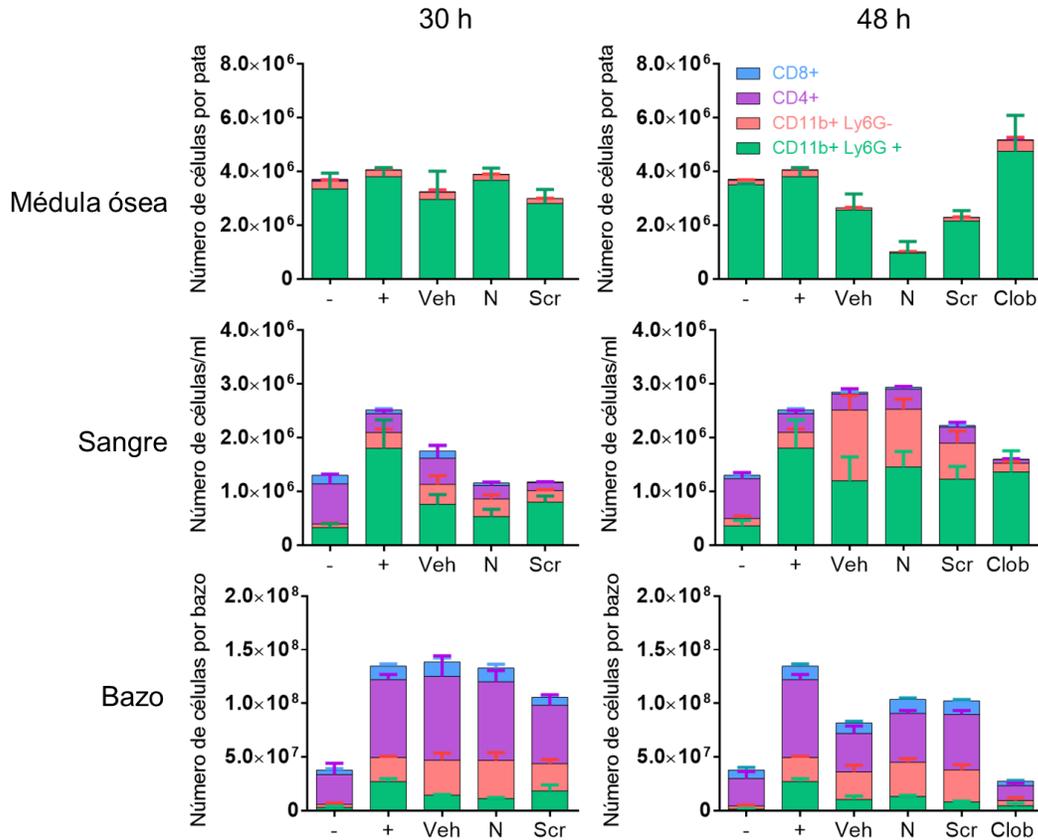


Figura 7.10. Cantidad de células inflamatorias en médula ósea, sangre y bazo al séptimo día del tratamiento con Imiquimod. Se presentan los resultados del conteo de las poblaciones celulares indicadas en las dos modalidades del ensayo: iniciando el tratamiento con el péptido a las 30 h o a las 48 h después de la primera aplicación de Imiquimod (n=3-4 ratones por grupo). (-, control negativo; +, control positivo, solo Imiquimod; **VEH**, Imiquimod + control vehicular del péptido; **N**, Imiquimod +péptido N; **Scr**, Imiquimod + péptido Scr). El diagrama de puntos para cada ratón se puede encontrar en el **Anexo 7.5**.

Otro parámetro que se consideró para valorar el efecto del péptido N en el modelo de psoriasis inducida por Imiquimod fue el peso del bazo. En respuesta al tratamiento con Imiquimod, el tamaño del bazo aumenta de manera considerable (van der Fits et al., 2009), indicativo de un proceso inflamatorio generalizado. En congruencia con esto, observamos que, en respuesta a los diferentes tratamientos, se hizo evidente que el tratamiento con Imiquimod indujo el aumento del tamaño del bazo, especialmente en el tratamiento con el vehículo del péptido, el cual resultó ser significativamente mayor en comparación al resto, en ambos tiempos de aplicación (**Fig 7.11**). De hecho, los resultados para los dos tiempos de aplicación probados tuvieron una baja variabilidad entre los diferentes tratamientos, presentando valores muy parecidos en los que se

mantuvo la tendencia del aumento del peso del bazo en los controles positivos y los tratamientos con los péptidos N y Scr por igual. Por otro lado, la aplicación del Clobetasol abatió la esplenomegalia inducida por Imiquimod, lo cual es un indicativo más del carácter sistémico de este fármaco.

En conjunto, estos resultados indican que la aplicación tópica del péptido N altera las proporciones de células inflamatorias en los tres compartimentos evaluados, pero de una manera menos radical que el Clobetasol, dejando la puerta abierta para montar un proceso inflamatorio a nivel sistémico.

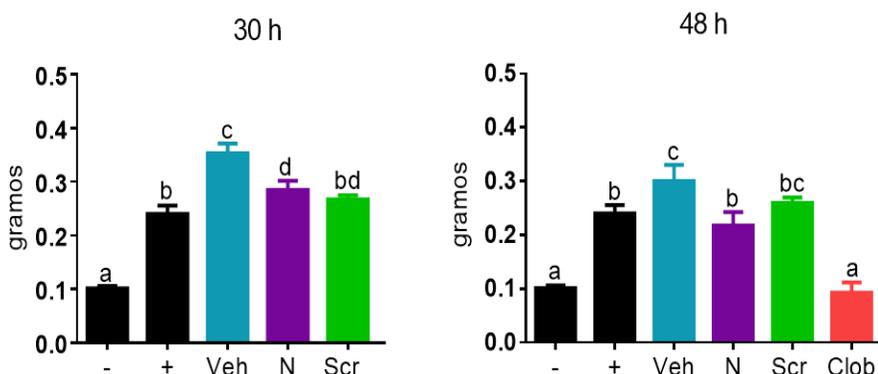


Figura 7.11. Peso de los bazos de los ratones en el experimento *in vivo* con Imiquimod. Se observa un agrandamiento del bazo en los ratones tratados con Imiquimod. Los grupos *abcd* fueron designados según la prueba de múltiples comparaciones usando el método LSD de Fisher no corregido, la matriz de valores p puede encontrarse en el **Anexo 7.6**. (n=3-4). (-, control negativo; +, control positivo, sólo Imiquimod; **VEH**, Imiquimod + control vehicular del péptido; **N**, Imiquimod + péptido N; **Scr**, Imiquimod + péptido Scr).

7.5.3. Los péptidos N, Na y K12A afectan la viabilidad de los fibroblastos dérmicos y queratinocitos humanos

Además de los factores angiogénicos producidos por las células de la piel y el infiltrado inflamatorio en las lesiones psoriásicas, los fibroblastos contribuyen a la angiogénesis produciendo diversos factores angiogénicos como son el VEGF y el FGF, y de manera importante,

moléculas para formar y remodelar la matriz extracelular (colágenas y metaloproteasas) (Nakatsu et al., 2003). Para evaluar si la inhibición de la angiogénesis que observamos *in vivo* en el ensayo de psoriasis podría deberse a que el péptido N y sus variantes Na y K12A inducen la muerte de los fibroblastos, se valoró el efecto citotóxico de los péptidos con fibroblastos humanos aislados de muestras de piel de individuos sanos y de pacientes con psoriasis (**Fig 7.12**). De una manera general, la curva dosis-respuesta para los fibroblastos de donadores sanos no resultó ser notoriamente diferente a la de fibroblastos provenientes de pacientes con psoriasis, siendo que ambos fueron igualmente susceptibles a la inducción de la muerte por efecto de los péptidos evaluados. Al igual que en los fibroblastos NIH-3T3, el péptido Na resultó ser significativamente más citotóxico desde concentraciones más bajas que el péptido N y el K12A. A diferencia de los fibroblastos de ratón NIH-3T3 que fueron afectados significativamente por los péptidos N y K12A desde una concentración de 10 μM , en los fibroblastos de piel humana se logró el mismo efecto hasta una concentración mayor de 15 μM .

En el contexto de la psoriasis, los queratinocitos que son el tipo celular más abundante de la epidermis adoptan un fenotipo hiperproliferativo generando acantosis en la piel, entendida como el engrosamiento de la epidermis. Considerando lo anterior, se realizaron ensayos de viabilidad con cristal violeta con la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (**Fig 7.12**). Los resultados indican que los péptidos son citotóxicos para los queratinocitos desde la concentración de 5 μM para la forma carboxiamidada Na, y 10 μM para los péptidos N y K12A. A 25 μM , los tres péptidos N, Na y K12A, indujeron la muerte de aproximadamente del 60 % al 70 % de las células.

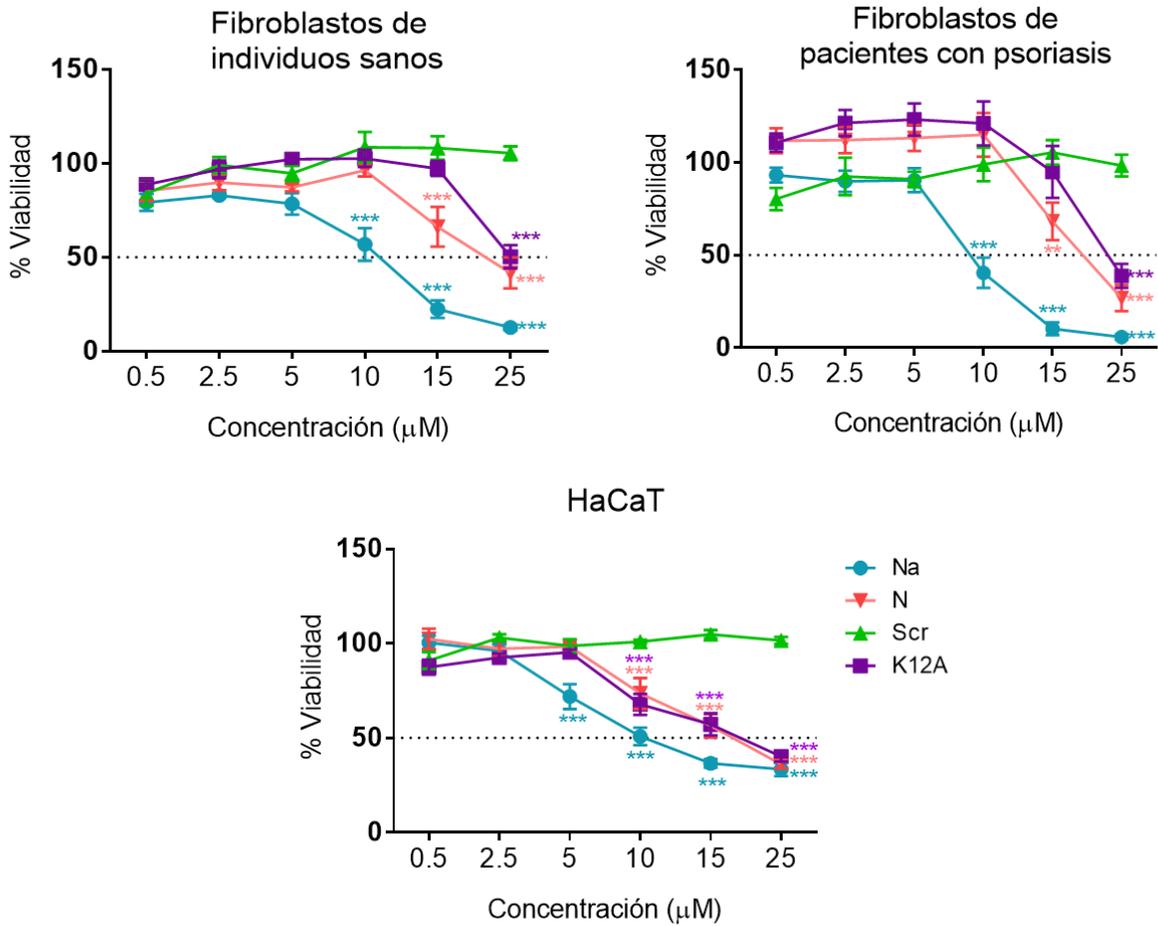


Figura 7.12. Viabilidad celular medida después de dos horas de incubación con los péptidos. Ensayos de viabilidad con cristal violeta para fibroblastos dérmicos primarios aislados de personas sanas y con psoriasis, y queratinocitos de la línea HaCaT. Significancia estadística con respecto al Scr. Test de múltiples comparaciones de Dunnett (** $p < 0.0001$ ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$). Resultados de dos réplicas experimentales independientes con tres pozos por concentración.

8. Discusión

En el presente proyecto se reporta la capacidad de un péptido de defensa aislado de la secreción cutánea de la rana *P. dacnicolor* de inducir la muerte de varios tipos celulares. Dicho péptido, denominado péptido N, junto con sus variantes Na (carboxiamidada) y K12A, mostró tener un efecto inhibitorio en el proceso de angiogénesis.

Los resultados obtenidos con los anillos aórticos de ratón indicaron que los péptidos N, Na y K12A inhiben la angiogénesis (**Fig 7.1**). Considerando que en el crecimiento angiogénico de los anillos aórticos participa una población mixta de células (endoteliales, pericitos, fibroblastos, macrófagos y dendríticas) y que en los **Antecedentes** de este trabajo se determinó que los péptidos N, K12A y Na eran altamente citotóxicos para las células leucocitarias, se procedió a evaluar el efecto de los péptidos directamente sobre líneas de células endoteliales y fibroblastos. Esto fue importante teniendo en cuenta que las células endoteliales constituyen el elemento principal de los vasos sanguíneos y los fibroblastos contribuyen a la angiogénesis remodelando y depositando la matriz extracelular, además de producir factores de crecimiento importantes para este proceso.

Los ensayos de viabilidad realizados con cultivos de células TeloHAEC (células endoteliales humanas derivadas de aorta e inmortalizadas) crecidas en monocapa mostraron que a la mayor concentración probada (25 μ M), los tres péptidos (N, Na y K12A) inducían la muerte de cerca del 50% de las células. De manera general el péptido Na mostró tener mayor actividad que el péptido N y el péptido K12A (**Fig 7.2**).

Cuando se evaluó el efecto de los péptidos sobre las células TeloHAEC, en condiciones de cultivo que permitían la formación de tubos se observaron resultados muy diferentes según el momento en el que se agregaron los péptidos. Si los péptidos se agregaban cuando las células ya se habían polarizado y formaban tubos, éstos no tenían un efecto significativo sobre la viabilidad de las células a concentraciones de hasta 15 μ M (**Fig 7.3**). En cambio, cuando las células y los péptidos se combinaron en suspensión a esta misma concentración, en el momento de sembrar las células, el efecto citotóxico del péptido Na, pero no de los péptidos N o K12A, fue evidente (**Fig 7.4**), lo cual pudo deberse a que una proporción de las células tratadas con el péptido Na haya muerto antes de lograr adherirse al sustrato y formar tubos. Lo anterior concuerda con los resultados de

los ensayos de viabilidad de azul tripano (**Fig 7.5**), en donde el péptido Na indujo la muerte de la mayoría de las células endoteliales a una concentración de 15 μ M cuando éstas se trataron en suspensión con los péptidos.

Por lo general, cuando las células TeloHAEC crecen en monocapa o están en suspensión, no presentan polaridad apico-basal. Cuando hacen contacto con las proteínas de matriz extracelular y los factores de crecimiento del Matrigel, establecen una polaridad apico-basal a través de las vías de señalización de VEGF y de NOTCH que les permite alinearse y formar estructuras tubulares con un lumen, con la zona apical orientada hacia el lumen del vaso y la zona basal en contacto con la lámina basal (Nakayama et al., 2013). En función de lo anterior, es posible que la mayor susceptibilidad de las células al efecto citotóxico de los péptidos cuando se encuentran formando una monocapa o están en suspensión, comparado a cuando están polarizadas refleje diferentes características fisicoquímicas de la membrana (Davis, Speichinger, Norden, Kim, & Bowers, 2015). En particular, es posible que la curvatura de la membrana sea determinante para la acción de los péptidos N, Na y K12A, como se ha reportado con péptidos de características similares (Chen & Mark, 2011). La dilucidación del mecanismo exacto por el cual los péptidos evaluados afectan las membranas celulares va más allá de los objetivos del presente proyecto, y constituye el principal objetivo de otros trabajos que se están llevando a cabo actualmente en nuestro grupo de investigación.

Los fibroblastos, el otro tipo celular que está involucrado de manera importante en la angiogénesis, fueron más sensibles al efecto citotóxico de los péptidos que las células endoteliales, siendo que desde la concentración de 10 μ M se observó la muerte de más del 50% de las células (**Fig 7.2** y **Fig 7.12**). Esto concuerda con los resultados de los experimentos en los que se evaluó la capacidad inhibitoria de la angiogénesis con ensayos de los anillos aórticos (**Fig 7.1**). No obstante, cabe resaltar que los experimentos que se reportan en este trabajo fueron realizados con cultivos 2D, con células en monocapa, adheridas a una superficie plana, un estado que no reconstituye las características de la estructura estratificada propia de este tipo celular. Por esta razón, para evaluar nuevamente la susceptibilidad de los queratinocitos y los fibroblastos a los péptidos, será necesario realizar este tipo de experimentos con células cultivadas en condiciones 3D.

En conjunto estos resultados sugieren que el efecto anti-angiogénico de los péptidos que se observó en los ensayos de anillos aórticos, no se debe a la inducción de la muerte de las células

endoteliales, sino más bien a la ausencia de los factores angiogénicos producidos por los fibroblastos o las células leucocitarias. Esto cobra aún más sentido si se considera que en el ensayo de la formación de tubos se suplementa a las células con todos los factores pro-angiogénicos recombinantes necesarios, que normalmente serían producidos por las células involucradas en el proceso (principalmente células inflamatorias y fibroblastos) (DeCicco-Skinner et al., 2014), lo que explicaría por qué los péptidos no afectaron la formación y mantenimiento de la red tubular formada por las células endoteliales TeloHAEC.

En general, la actividad de los péptidos evaluados demostró tener una tendencia clara: la forma carboxiamidada Na resultó ser la más eficiente en la mayoría de los ensayos, mientras que los péptidos K12A y N, demostraron tener actividades comparables en todos los experimentos, a excepción de los ensayos de viabilidad con fibroblastos, en los cuales el N resultó ser ligeramente más eficiente. Esto puede explicarse con base en las diferencias estructurales que presentan los tres péptidos. Se ha reportado que la carboxiamidación de péptidos antimicrobianos estructuralmente similares a los utilizados en este proyecto es importante para promover la estabilidad de las hélices en la interfaz membranal, lo cual a su vez incrementa la concentración local del péptido y facilita la formación de poros o de micelas que desintegran la estructura membranal (Mura et al., 2016). Por otro lado, para el caso del péptido K12A, el reemplazo de una lisina por una alanina resulta en una disminución de la carga neta del péptido, lo que alteraría en cierta medida su interacción electrostática con la membrana.

En un contexto inflamatorio *in vivo*, la angiogénesis tiene un papel fundamental ya que es la que permite responder a la demanda de nutrientes y oxígeno de los tejidos; además, facilita la migración de células inflamatorias al lugar de la lesión. Así, muchos procesos inflamatorios se asocian con una angiogénesis exacerbada que en la mayoría de los casos da lugar al mantenimiento y progreso de la inflamación. Más particularmente, siendo la angiogénesis un proceso esencial para el desarrollo de la psoriasis, se ha propuesto interferir con ella para evitar el progreso de la enfermedad (Shaker et al., 2013; Weidemann, Crawshaw, Byrne, & Young, 2013). Sin embargo, tratar este tipo de afecciones inhibiendo sólo la angiogénesis no es suficiente, y es necesario poder manipular la capacidad inmunoreguladora del organismo para contener y evitar la inflamación crónica. Considerando que los péptidos N, Na y K12A demostraron tener un efecto citotóxico sobre las células inflamatorias y además un efecto anti-angiogénico *ex vivo*, se evaluó la posibilidad de que estos péptidos tuvieran un potencial para tratar padecimientos en los que

además de una inflamación, hubiera un proceso angiogénico importante asociado a ella, por esta razón se probó la efectividad del péptido N *in vivo*, en el modelo murino de psoriasis inducida por Imiquimod. Se seleccionó el péptido N en primera instancia por mostrar una actividad intermedia, y posiblemente menos tóxica al ser administrada en un organismo que la que pudiera tener el péptido Na, que fue más activo en los ensayos *in vitro*.

La evaluación visual de los animales en el modelo de psoriasis inducido por Imiquimod, mostró que la aplicación tópica del péptido N aminora ligeramente la aparición de las lesiones psoriásicas (**Fig 7.7**). Así mismo, disminuyó la angiogénesis en la piel tratada sin importar su tiempo de aplicación (30 o 48 h después de la primera aplicación de Imiquimod) (**Fig. 7.10**). A nivel histológico, las tinciones de hematoxilina-eosina mostraron que el efecto del péptido fue más evidente cuando su aplicación inició a las 30 h después de haber iniciado el tratamiento con Imiquimod, observándose menor infiltrado inflamatorio en la piel tratada comparado con los ratones control (**Fig. 7.9**). Como control vehicular de los péptidos, se empleó una crema cuya formulación es similar a la del vehículo del Imiquimod (Aldara). Esta crema provoca, por sí sola, una disminución visible de la formación de placas psoriásicas, aunque no inhibe el aumento de la vascularización. El uso de un control más apropiado se vuelve importante en este caso ya que la gran mayoría de los estudios referentes a este modelo reportan el uso de glicerina (si bien uno de los componentes del vehículo, mas no el único) como control negativo, la cual, a diferencia del vehículo usado en estos experimentos, no tiene un efecto emoliente.

Los linfocitos T CD4+, los neutrófilos y las células dendríticas son las células cuya función se ve exacerbada en las lesiones psoriásicas (Nickoloff & Nestle, 2004). Aunque en este trabajo no se pudo evaluar la presencia de estas células en los cortes de piel de los animales de los diferentes grupos experimentales, se evaluaron las proporciones relativas de estas células en médula ósea, sangre y bazo de los ratones. Dependiendo del tiempo en el que se inició el tratamiento con el péptido N (30 h ó 48 h después del inicio de la aplicación del Imiquimod), los niveles de las células inflamatorias evaluadas, principalmente de los neutrófilos, variaron considerablemente. Cuando el péptido N fue aplicado a las 30 h después del inicio del tratamiento con Imiquimod se registró una disminución en los niveles de neutrófilos en la sangre en comparación con los animales tratados únicamente con Imiquimod. En cambio, cuando el tratamiento con el péptido se realizó desde las 48 h después de la primera aplicación de Imiquimod, se observó un aumento en el número de neutrófilos en la sangre, el cual refleja una migración incrementada de los mismos

desde la médula ósea. El tratamiento con Clobetasol, un corticosteroide usado en el tratamiento de la psoriasis tuvo efectos prácticamente opuestos sobre la abundancia relativa de las diferentes estirpes celulares analizadas, lo cual señala que el péptido N y el Clobetasol actúan por mecanismos diferentes (**Fig 7.11**).

A pesar de que el péptido N aparentemente disminuyó el número de neutrófilos en la sangre, el infiltrado inflamatorio en el tejido y el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en la piel en respuesta al insulto con Imiquimod, el tratamiento con el péptido no contuvo el aumento en el peso del bazo característico de este modelo experimental. En cambio, el Clobetasol, un compuesto que promueve la síntesis de proteínas antiinflamatorias e inhibe la producción de varios mediadores inflamatorios como el ácido araquidónico y las prostaglandinas, impidió claramente el incremento en el tamaño del bazo inducido por el Imiquimod, y mantuvo una celularidad comparable a la de los ratones controles negativo (ratones -, no tratados con Imiquimod).

Globalmente, los resultados sugieren que, según el momento de aplicación, el péptido N podría modificar la cinética de la expresión de las principales citocinas implicadas en el modelo de psoriasis. El pico de expresión de IL-23p19 se da cerca del tercer día de tratamiento (**Fig 1.3**), desencadenando la expresión de las demás citocinas características de la respuesta inflamatoria de tipo Th17 propia de la psoriasis. Al iniciar la aplicación del péptido N a las 48 h de haber empezado el tratamiento con Imiquimod, el péptido no pudo frenar la llegada de los neutrófilos a las lesiones psoriásicas, ya que para ese tiempo ya se habría dado el pico de expresión de IL-23p19, los niveles de las demás citocinas ya empezarían a incrementar y a establecer un ambiente proinflamatorio junto con la señalización para el reclutamiento de dichas células. Lo anterior se evidenció en el aumento de neutrófilos en la sangre y a nivel histológico, en el infiltrado leucocitario en las pieles

Desafortunadamente, los experimentos preliminares que se realizaron para evaluar los niveles de citocinas secretadas por los explantes de la piel de los ratones de los distintos grupos experimentales (**Anexo 8.1**) no permitieron concluir acerca de esta hipótesis. En la realización de estas mediciones pudieron haberse cometido varios errores en cuanto al diseño de los experimentos. El primero, y probablemente el de mayor peso, es el momento en el que se realizaron las medidas. Los explantes de piel se obtuvieron al momento del sacrificio de los animales, es decir en promedio 140 h después de iniciar el tratamiento con Imiquimod, cuando los niveles de las citocinas disminuyen (**Fig 1.3**). Es posible además que el volumen de medio de

cultivo en el que se colocaron los explantes haya sido demasiado grande y que la falta de inhibidores de proteasas resultara en concentraciones de citocinas más bajas de lo que detecta el ensayo multiplex que se empleó. Disponer de esta información es claramente importante para la validación del efecto anti-angiogénico y potencialmente antiinflamatorio del péptido N y que es interesante resolver.

Los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos constituyen actualmente los tratamientos de elección para enfermedades como la psoriasis. El principal mecanismo de acción de este tipo de medicamentos es promover la síntesis de proteínas antiinflamatorias e inhibir la producción de varios mediadores inflamatorios, como los niveles de ácido araquidónico y prostaglandinas, lo que resulta en un estado de inmunosupresión, haciendo a los pacientes más vulnerables a infecciones oportunistas. En este sentido, las ventajas que tendría la implementación de una molécula como lo es el péptido N es que, por un lado, como se muestra en este trabajo, su aplicación tiene el potencial de disminuir la inflamación local en el tejido lesionado, y, por otro lado, su capacidad antimicrobiana (ver sección de **Antecedentes**) estaría confiriendo protección ante infecciones oportunistas. Por último, el uso de péptidos con estas capacidades biológicas podría ser implementado para el tratamiento de otras enfermedades diferentes a la psoriasis, en las que haya un proceso angiogénico patológico importante como, por ejemplo, el cáncer o la degeneración macular.

9. Conclusiones

1. El efecto anti-angiogénico producido por los péptidos N, Na y K12A probablemente involucre la inducción de la muerte de células inflamatorias y fibroblastos, lo que priva a las células endoteliales de varios de los factores de crecimiento y citocinas que son necesarias para desencadenar el proceso de angiogénesis.
2. Los vasos sanguíneos ya establecidos tienen poca o nula susceptibilidad a ser afectados por los péptidos N, Na y K12A.
3. El péptido N logra inhibir el proceso de angiogénesis en el modelo *in vivo* de psoriasis inducida por Imiquimod.

10. Perspectivas

1. Evaluar de manera cuantitativa los niveles de células inflamatorias en el tejido tratado en el modelo de psoriasis.
2. Demostrar cómo se ve afectada la viabilidad de las células inflamatorias, fibroblastos y queratinocitos *in vivo* por la acción de los péptidos e *in vitro* en cultivos 3D.
3. Evaluar el efecto de los péptidos en otras células implicadas en la angiogénesis como los pericitos, las células dendríticas y los macrófagos residentes en el tejido de los anillos aórticos.
4. Analizar el mecanismo de acción de los péptidos para la inducción de la muerte celular y el efecto anti-angiogénico.
5. Evaluar la efectividad de la aplicación de los péptidos en otro modelo de angiogénesis *in vivo*, como en modelos de cáncer tumoral.

11. Referencias

- Amiche, M., Delfour, A., & Nicolas, P. (1999). La peau des grenouilles: un mini-laboratoire pour les biotechnologies. *Revue du Palais de la découverte*, 27(269), 11-21.
- Arora, N., Shah, K., & Pandey-Rai, S. (2016). Inhibition of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice by herbal extracts from some Indian medicinal plants. *Protoplasma*, 253(2), 503–515. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0829-y>
- Auvynet, C., El Amri, C., Lacombe, C., Bruston, F., Bourdais, J., Nicolas, P., & Rosenstein, Y. (2008). Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9. *FEBS Journal*, 275(16), 4134–4151. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06554.x>
- Ben-Av, P., Crofford, L. J., Wilder, R. L., & Hla, T. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Letters*, 372(1), 83–87. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00956-A](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00956-A)
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. *Journal of Cell Biology*, 106(March), 761–771.
- Burton, C. (1954). Relation of structure of the wall of blood vessels. *Physiological Reviews*, 34(4), 619–642.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Carpentier G, Martinelli M, Courty J and Cascone I. Angiogenesis Analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings. Mondorf-les-Bains, Luxembourg. ISBN: 2-919941-18-6 : 198-201, 2012.
- Carrascosa, J. M., López-Esteban, J. L., Carretero, G., Daudén, E., Ferrándiz, C., Vidal, D., ... Puig, L. (2011). Documento de consenso de fototerapia en psoriasis del Grupo Español de Psoriasis: ultravioleta B de banda estrecha (UVBBE), láser y fuentes monocromáticas de excímeros y terapia fotodinámica. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 102(3), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2010.11.002>
- Chen, R., & Mark, A. E. (2011). The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: Implications for binding and the mechanism of action. *European Biophysics Journal*, 40(4), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0677-4>
- Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M. A., Cotton, M., & Christofori, G. (2000). Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 60(24), 7163–7169.
- Davis, G. E., Speichinger, K. R., Norden, P. R., Kim, D. J., & Bowers, S. L. K. (2015). Endothelial Cell Polarization During Lumen Formation, Tubulogenesis, and Vessel Maturation in 3D Extracellular Matrices. In K. Ebnet (Ed.), *Cell Polarity 1: Biological Role and Basic Mechanisms* (pp. 205–220). https://doi.org/10.1007/978-3-319-14463-4_9
- DeCicco-Skinner, K. L., Henry, G. H., Cataisson, C., Tabib, T., Curtis Gwilliam, J., Watson, N. J., ...

- Wiest, J. S. (2014). Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, *10*(91), 1–8.
<https://doi.org/10.3791/51312>
- Dell'Aica, I., Niero, R., Piazza, F., Cabrelle, A., Sartor, L., Colalto, C., ... Garbisa, S. (2007). Hyperforin blocks neutrophil activation of matrix metalloproteinase-9, motility and recruitment, and restrains inflammation-triggered angiogenesis and lung fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *321*(2), 492–500.
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.116459>
- Dell'Aica, I., Sartor, L., Galletti, P., Giacomini, D., Quintavalla, A., Calabrese, F., ... Garbisa, S. (2006). Inhibition of leukocyte elastase, polymorphonuclear chemoinvasion, and inflammation-triggered pulmonary fibrosis by a 4-alkyliden- β -lactam with a galloyl moiety. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *316*(2), 539–546.
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.096248>
- Deslouches, B., & Di, Y. P. (2017). Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget*, *8*(28), 46635–46651. Retrieved from www.impactjournals.com/oncotarget/
- Donà, M., Dell'Aica, I., Calabrese, F., Benelli, R., Morini, M., Albini, A., & Garbisa, S. (2003). Neutrophil Restraint by Green Tea: Inhibition of Inflammation, Associated Angiogenesis, and Pulmonary Fibrosis. *The Journal of Immunology*, *170*(8), 4335–4341.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4335>
- Duthie, M. S., Kimber, I., & Norval, M. (1999). The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *British Journal of Dermatology*, *140*(6), 995–1009.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02898.x>
- Elfarnawany, Mai H., "Signal Processing Methods for Quantitative Power Doppler Microvascular Angiography" (2015). Electronic Thesis and Dissertation Repository. 3106.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. *Cancer Cell*, *17*(2), 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.041>
- Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Corsi, R., Severini, C., ... Kreil, G. (1989). Deltorphins: A family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for δ opioid binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(13), 5188–5192. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.5188>
- Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri Erspamer, G., Montecucchi, P. C., & de Castiglione, R. (1985). Phyllomedusa skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides*, *6*(SUPPL. 3), 7–12. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90343-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90343-2)
- Feldman, S. R., & Yentzer, B. A. (2009). Topical clobetasol propionate in the treatment of psoriasis: A review of newer formulations. *American Journal of Clinical Dermatology*, *10*(6), 397–406. <https://doi.org/10.2165/11311020-000000000-00000>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(4), 343–346.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

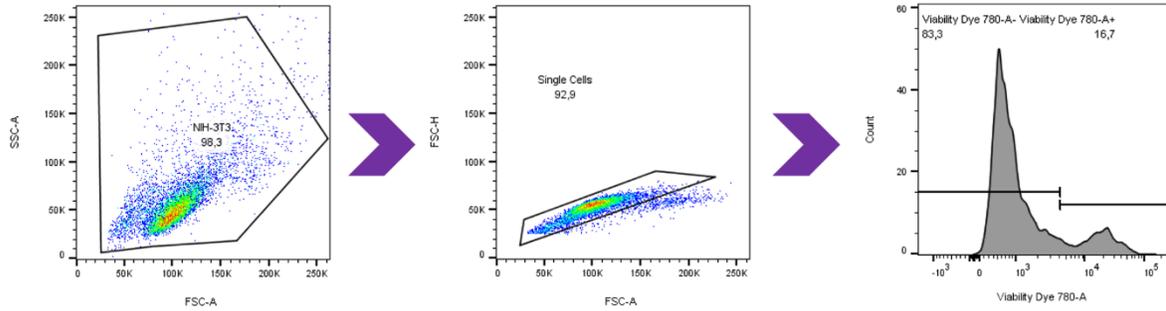
- Fernandez, D. I., Gehman, J. D., & Separovic, F. (2009). Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(8), 1630–1638. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.007>
- Greaves, M. W., & Winstein, G. D. (1995). Treatment of psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 332(9), 581–589. <https://doi.org/10.1177/1461444810365020>
- Griffiths, C. E., & Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, 370(9583), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61128-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61128-3)
- Harden, J. L., Krueger, J. G., & Bowcock, A. M. (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.008>
- Huerta, C., Rivero, E., & García Rodríguez, L. A. (2007). Incidence and risk factors for psoriasis in the general population. *Archives of Dermatology*, 143(12), 1559–1565. <https://doi.org/10.1001/archderm.143.12.1559>
- Jackson, J. R., Seed, M. P., Kircher, C. H., Willoughby, D. A., & Winkler, J. D. (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB Journal*, 11(6), 457–465. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.6.9194526>
- Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M. J., Post, M. J., De Winther, M. P. J., & Donners, M. M. P. C. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*, 17(1), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9381-6>
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: Structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 422–433. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>
- Langley, R. G., Elewski, B. E., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C. E. M., Papp, K., ... Papavassilis, C. (2014). Secukinumab in plaque psoriasis - Results of two phase 3 trials. *New England Journal of Medicine*, 371(4), 326–338. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314258>
- Lawley, T. J., & Kubota, Y. (1989). Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *Journal of Investigative Dermatology*, 93(2 SUPPL.), S59–S61. <https://doi.org/10.1038/jid.1989.10>
- Li, Z. J., Sohn, K. C., Choi, D. K., Shi, G., Hong, D., Lee, H. E., ... Lee, J. H. (2013). Roles of TLR7 in Activation of NF-κB Signaling of Keratinocytes by Imiquimod. *PLoS ONE*, 8(10), 4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077159>
- Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L. C., Duan, S., Gardner, J., ... Bowcock, A. M. (2008). A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genetics*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000041>
- Lowes, M. A., Suárez-Far, M., & Krueger, J. G. (2014). IY32CH08-Lowes-Krueger Immunology of Psoriasis. *Annu. Rev. Immunol*, 32, 227–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120225>
- Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R., & Orci, L. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.19.7297>

- Moos, S., Mohebiany, A. N., Waisman, A., & Kurschus, F. C. (2019). Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice Depends on the IL-17 Signaling of Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *139*(5), 1110–1117. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.006>
- Mura, M., Wang, J., Zhou, Y., Pinna, M., Zvelindovsky, A. V., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2016). The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides. *European Biophysics Journal*, *45*(3), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1094-x>
- Nakatsu, M. N., Sainson, R. C. A., Aoto, J. N., Taylor, K. L., Aitkenhead, M., Pérez-del-Pulgar, S., ... Hughes, C. C. W. (2003). Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: The role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvascular Research*, *66*(2), 102–112. [https://doi.org/10.1016/S0026-2862\(03\)00045-1](https://doi.org/10.1016/S0026-2862(03)00045-1)
- Nakayama, M., Nakayama, A., Van Lessen, M., Yamamoto, H., Hoffmann, S., Drexler, H. C. A., ... Adams, R. H. (2013). Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature Cell Biology*, *15*(3), 249–260. <https://doi.org/10.1038/ncb2679>
- Nickoloff, B. J., & Nestle, F. O. (2004). *Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities*. *113*(12), 1664–1675. <https://doi.org/10.1172/JCI200422147>.The
- Noonan, D. M., De Lerma Barbaro, A., Vannini, N., Mortara, L., & Albin, A. (2008). Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: Decisions and indecisions. *Cancer and Metastasis Reviews*, *27*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9108-5>
- Petes, C., Odoardi, N., & Gee, K. (2017). The Toll for trafficking: Toll-like receptor 7 delivery to the endosome. *Frontiers in Immunology*, *8*(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01075>
- Puxeddu, I., Berkman, N., Nissim Ben Efraim, A. H., Davies, D. E., Ribatti, D., Gleich, G. J., & Levi-Schaffer, F. (2009). The role of eosinophil major basic protein in angiogenesis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *64*(3), 368–374. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01822.x>
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2009). Immune cells and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(9 A), 2822–2833. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00810.x>
- Sanchez, B., Li, L., Dulong, J., Aimond, G., Lamartine, J., Liu, G., & Sigaudou-Roussel, D. (2019). Impact of human dermal microvascular endothelial cells on primary dermal fibroblasts in response to inflammatory stress. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00044>
- Shaker, O. G., Khairallah, M., Rasheed, H. M., Abdel-Halim, M. R., Abuzeid, O. M., El Tawdi, A. M., ... Ashmaui, A. (2013). Antiangiogenic Effect of Methotrexate and PUVA on Psoriasis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *67*(2), 735–742. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9563-2>
- Sozzani, S., Rusnati, M., Riboldi, E., Mitola, S., & Presta, M. (2007). Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends in Immunology*, *28*(9), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.006>
- Sumida, H., Yanagida, K., Kita, Y., Abe, J., Matsushima, K., Nakamura, M., ... Shimizu, T. (2014).

- Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine Model of Imiquimod-Induced Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 192(9), 4361–4369. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302959>
- Terhorst, D., Chelbi, R., Wohn, C., Malosse, C., Tamoutounour, S., Jorquera, A., ... Henri, S. (2015). Dynamics and Transcriptomics of Skin Dendritic Cells and Macrophages in an Imiquimod-Induced, Biphasic Mouse Model of Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4953–4961. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500551>
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., ... Lubberts, E. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5836–5845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802999>
- van Zoggel, H., Carpentier, G., Dos Santos, C., Hamma-Kourbali, Y., Courty, J., Amiche, M., & Delbé, J. (2012). Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide Dermaseptin B2. *PLoS ONE*, 7(9), 25–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044351>
- Weidemann, A. K., Crawshaw, A. A., Byrne, E., & Young, H. S. (2013). Vascular endothelial growth factor inhibitors: Investigational therapies for the treatment of psoriasis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 233–244. <https://doi.org/10.2147/CCID.S35312>
- Wu, H.-H., Xie, W.-L., Zhao, Y.-K., Liu, J.-H., & Luo, D.-Q. (2016). Imiquimod Increases Cutaneous VEGF Expression in Imiquimod-induced Psoriatic Mouse Model. *Current Vascular Pharmacology*, 14(3), 275–279. Retrieved from <https://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/cvp/2016/00000014/00000003/art00008>

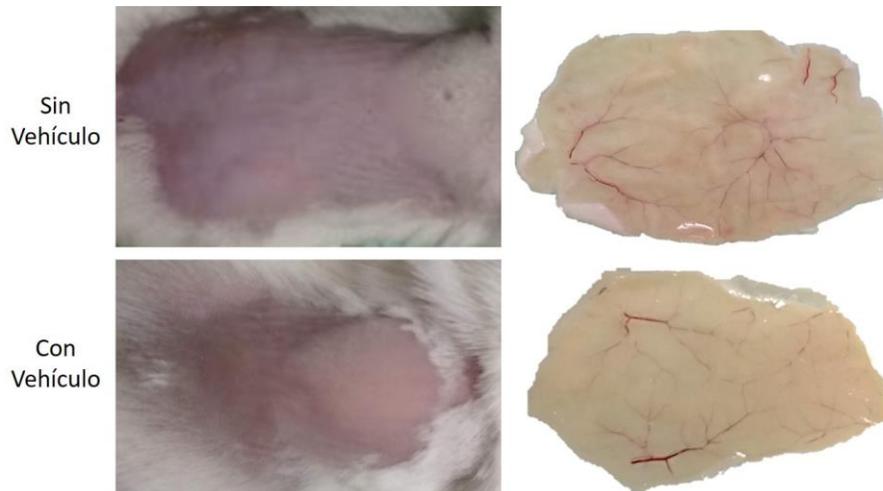
12. Anexos

6.1. Estrategia de gating para los ensayos de viabilidad con citometría de flujo.



6.2. Inocuidad de la crema vehicular.

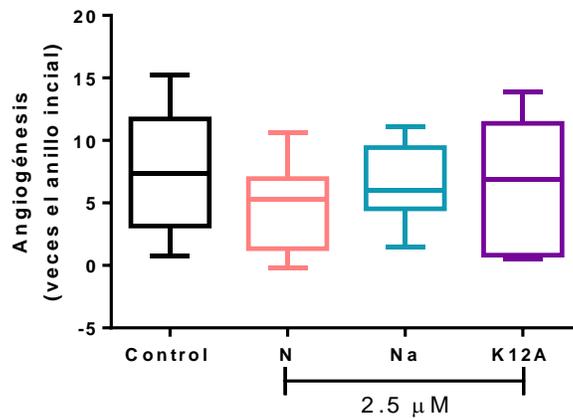
Se realizó una prueba aplicando tópicamente la crema blanca (vehículo de los péptidos utilizado en el modelo de psoriasis inducida por imiquimod) sobre la piel de los ratones sanos. La aplicación de la crema blanca no tuvo un efecto significativo ni en la coloración ni en la vascularización de la piel.



6.3. Detalles de anticuerpos usados en citometría de flujo.

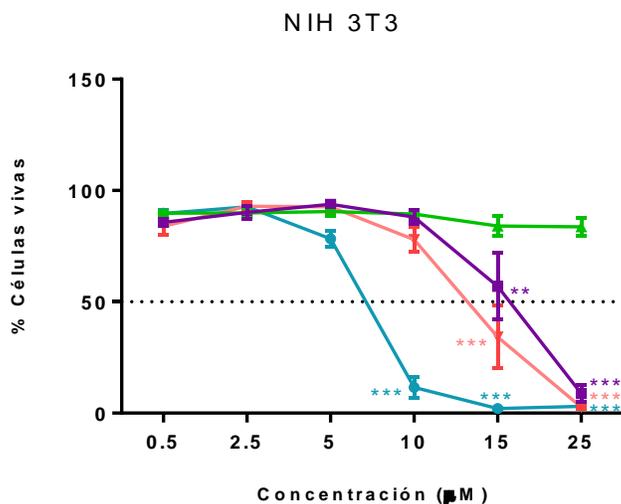
Anticuerpo	Clona	Marca	# Catálogo	Lote	Dilución
Anti-Mouse CD4 PerCP	RM4-5	TONBO Biosciences	67-0042-U100	C0042120116673	1:100
Brilliant Violet 510 anti-mouse CD8	53-6.7	Biolegend	100752		1:100
Anti-Human/Mouse APC	M1/70	TONBO Biosciences	20-0112-U100	C0112011519203	1:100
Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) FITC	RB6-8C5	TONBO Biosciences	35-5931-U500	C5931102715354	1:100
Anti-Mouse CD3a PE	145-2C11	TONBO Biosciences	50-0031-U100	C0031050819503	1:100

7.1. Efecto de los péptidos N, Na y K12A en los anillos aórticos a concentración de 2.5 µM.



Efecto de los péptidos en el crecimiento angiogénico en el ensayo de anillos aórticos. Se muestran los resultados del área de angiogénesis al cuarto día después de la aplicación de los péptidos. Los datos fueron analizados mediante la prueba de múltiples comparaciones de Dunnett, después de haber realizado el análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos.

7.2. Ensayo de viabilidad por citometría de flujo con fibroblastos NIH 3T3



Viabilidad celular medida después de dos h de incubación con los péptidos de fibroblastos NIH-3T3. Ensayo de viabilidad por citometría de flujo. Test de múltiples comparaciones de Dunnett (** $p < 0.0001$ ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$).

7.3. Matriz de valores p de Fig 7.7.

- **Eritema (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-3,000	Yes	***	0,0003
- vs. Veh	-1,750	Yes	*	0,0313
- vs. N	-2,000	Yes	**	0,0052
- vs. Scr	-2,750	Yes	***	0,0010
+ vs. Veh	1,250	No	ns	0,1073
+ vs. N	1,000	No	ns	0,1138
+ vs. Scr	0,2500	No	ns	0,6999
Veh vs. N	-0,2500	No	ns	0,7338
Veh vs. Scr	-1,000	No	ns	0,2111
N vs. Scr	-0,7500	No	ns	0,2592

- **Eritema (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-3,107	Yes	****	< 0,0001
- vs. Veh	-3,190	Yes	****	< 0,0001
- vs. N	-2,107	Yes	****	< 0,0001
- vs. Scr	-2,524	Yes	****	< 0,0001
- vs. Clob	-3,357	Yes	****	< 0,0001
+ vs. Veh	-0,08333	No	ns	0,8735
+ vs. N	1,000	No	ns	0,0502
+ vs. Scr	0,5833	No	ns	0,2728
+ vs. Clob	-0,2500	No	ns	0,6072
Veh vs. N	1,083	Yes	*	0,0496
Veh vs. Scr	0,6667	No	ns	0,2421
Veh vs. Clob	-0,1667	No	ns	0,7505
N vs. Scr	-0,4167	No	ns	0,4298
N vs. Clob	-1,250	Yes	*	0,0171
Scr vs. Clob	-0,8333	No	ns	0,1232

- **Placas (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-3,250	Yes	***	0,0009
- vs. Veh	-0,5000	No	ns	0,5928
- vs. N	-2,000	Yes	*	0,0196
- vs. Scr	-2,000	Yes	*	0,0283
+ vs. Veh	2,750	Yes	*	0,0106
+ vs. N	1,250	No	ns	0,1183
+ vs. Scr	1,250	No	ns	0,1453
Veh vs. N	-1,500	No	ns	0,1252
Veh vs. Scr	-1,500	No	ns	0,1439

N vs. Scr	0,0	No	ns	> 0,9999
-----------	-----	----	----	----------

• **Placas (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-3,250	Yes	****	< 0,0001
- vs. Veh	-1,667	Yes	**	0,0025
- vs. N	-1,750	Yes	***	0,0007
- vs. Scr	-3,000	Yes	****	< 0,0001
- vs. Clob	-1,500	Yes	**	0,0027
+ vs. Veh	1,583	Yes	**	0,0076
+ vs. N	1,500	Yes	**	0,0065
+ vs. Scr	0,2500	No	ns	0,6428
+ vs. Clob	1,750	Yes	**	0,0021
Veh vs. N	-0,08333	No	ns	0,8768
Veh vs. Scr	-1,333	Yes	*	0,0297
Veh vs. Clob	0,1667	No	ns	0,7568
N vs. Scr	-1,250	Yes	*	0,0293
N vs. Clob	0,2500	No	ns	0,6166
Scr vs. Clob	1,500	Yes	*	0,0108

• **Grosor (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-3,000	Yes	**	0,0023
- vs. VEH	-1,000	No	ns	0,3142
- vs. N	-1,500	No	ns	0,0776
- vs. Scr	-0,5000	No	ns	0,5625
+ vs. VEH	2,000	No	ns	0,0575
+ vs. N	1,500	No	ns	0,0776
+ vs. Scr	2,500	Yes	*	0,0115

VEH vs. N	-0,5000	No	ns	0,6090
VEH vs. Scr	0,5000	No	ns	0,6273
N vs. Scr	1,000	No	ns	0,2566

• **Puntaje acumulado (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-6,250	Yes	***	0,0003
- vs. Veh	-2,250	No	ns	0,1648
- vs. N	-4,000	Yes	**	0,0073
- vs. Scr	-4,750	Yes	**	0,0041
+ vs. Veh	4,000	Yes	*	0,0220
+ vs. N	2,250	No	ns	0,0950
+ vs. Scr	1,500	No	ns	0,2853
Veh vs. N	-1,750	No	ns	0,2722
Veh vs. Scr	-2,500	No	ns	0,1448
N vs. Scr	-0,7500	No	ns	0,5863

• **Puntaje acumulado (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-6,357	Yes	****	< 0,0001
- vs. Veh	-4,857	Yes	****	< 0,0001
- vs. N	-3,857	Yes	****	< 0,0001
- vs. Scr	-5,524	Yes	****	< 0,0001
- vs. Clob	-4,857	Yes	****	< 0,0001
+ vs. Veh	1,500	No	ns	0,1001
+ vs. N	2,500	Yes	**	0,0057
+ vs. Scr	0,8333	No	ns	0,3489
c+ vs. Clob	1,500	No	ns	0,0774
Veh vs. N	1,000	No	ns	0,2634

Veh vs. Scr	-0,6667	No	ns	0,4811
Veh vs. Clob	0,0	No	ns	> 0,9999
N vs. Scr	-1,667	No	ns	0,0699
N vs. Clob	-1,000	No	ns	0,2283
Scr vs. Clob	0,6667	No	ns	0,4518

- **Puntaje acumulado (30 h- incluyendo grosor de la piel)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-9,250	Yes	****	< 0,0001
- vs. Veh	-3,250	No	ns	0,0799
- vs. N	-5,500	Yes	**	0,0019
- vs. Scr	-5,917	Yes	**	0,0019
+ vs. Veh	6,000	Yes	**	0,0041
+ vs. N	3,750	Yes	*	0,0192
+ vs. Scr	3,333	Yes	*	0,0460
Veh vs. N	-2,250	No	ns	0,2100
Veh vs. Scr	-2,667	No	ns	0,1622
N vs. Scr	-0,4167	No	ns	0,7856

7.4. Matriz de valores p de la Figura 7.9.

- **Diámetro promedio (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,08699	No	ns	0,2534
- vs. Veh	-0,2977	Yes	**	0,0019
- vs. N	0,03974	No	ns	0,5962
- vs. Scr	-0,08493	No	ns	0,2644
+ vs. Veh	-0,2107	Yes	*	0,0311

+ vs. N	0,1267	No	ns	0,1452
+ vs. Scr	0,002058	No	ns	0,9805
Veh vs. N	0,3375	Yes	**	0,0015
Veh vs. Scr	0,2128	Yes	*	0,0297
N vs. Scr	-0,1247	No	ns	0,1515

• **Diámetro promedio (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,08699	No	ns	0,3121
- vs. Veh	-0,2653	Yes	**	0,0097
- vs. N	-0,1262	No	ns	0,1483
- vs. Scr	-0,05630	No	ns	0,5487
- vs. Clob	-0,2062	Yes	*	0,0236
+ vs. Veh	-0,1783	No	ns	0,0969
+ vs. N	-0,03924	No	ns	0,6826
+ vs. Scr	0,03069	No	ns	0,7670
+ vs. Clob	-0,1192	No	ns	0,2224
Veh vs. N	0,1390	No	ns	0,1891
Veh vs. Scr	0,2090	No	ns	0,0707
Veh vs. Clob	0,05905	No	ns	0,5697
N vs. Scr	0,06992	No	ns	0,5016
N vs. Clob	-0,07999	No	ns	0,4078
Scr vs. Clob	-0,1499	No	ns	0,1583

• **Diámetro mayor (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,2563	Yes	*	0,0247
- vs. Veh	-0,3323	Yes	**	0,0099
- vs. N	0,07310	No	ns	0,4916

- vs. Scr	-0,1025	No	ns	0,3379
+ vs. Veh	-0,07600	No	ns	0,5565
+ vs. N	0,3294	Yes	*	0,0121
+ vs. Scr	0,1537	No	ns	0,2076
Veh vs. N	0,4054	Yes	**	0,0053
Veh vs. Scr	0,2297	No	ns	0,0876
N vs. Scr	-0,1756	No	ns	0,1527

• **Diámetro mayor (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,2563	Yes	*	0,0411
- vs. Veh	-0,1083	No	ns	0,4109
- vs. N	-0,2248	No	ns	0,0698
- vs. Scr	-0,2197	No	ns	0,1043
- vs. Clob	-0,3436	Yes	**	0,0085
+ vs. Veh	0,1480	No	ns	0,3122
+ vs. N	0,03147	No	ns	0,8141
+ vs. Scr	0,03652	No	ns	0,8005
+ vs. Clob	-0,08732	No	ns	0,5161
Veh vs. N	-0,1165	No	ns	0,4238
Veh vs. Scr	-0,1115	No	ns	0,4734
Veh vs. Clob	-0,2353	No	ns	0,1152
N vs. Scr	0,005054	No	ns	0,9721
N vs. Clob	-0,1188	No	ns	0,3793
Scr vs. Clob	-0,1238	No	ns	0,3958

• **Densidad vascular (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,3916	No	ns	0,1644

- vs. Veh	-1,110	Yes	**	0,0035
- vs. N	0,02632	No	ns	0,9315
- vs. Scr	-0,4553	No	ns	0,1491
+ vs. Veh	-0,7189	Yes	*	0,0434
+ vs. N	0,4179	No	ns	0,1834
+ vs. Scr	-0,06374	No	ns	0,8352
Veh vs. N	1,137	Yes	**	0,0052
Veh vs. Scr	0,6552	No	ns	0,0834
N vs. Scr	-0,4816	No	ns	0,1627

• **Densidad vascular (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,3916	Yes	*	0,0130
- vs. Veh	-0,1749	No	ns	0,3397
- vs. N	0,01197	No	ns	0,9312
- vs. Scr	-0,1532	No	ns	0,3288
- vs. Clob	-0,9766	Yes	****	< 0,0001
+ vs. Veh	0,2167	No	ns	0,2390
+ vs. N	0,4035	Yes	**	0,0068
+ vs. Scr	0,2383	No	ns	0,1337
+ vs. Clob	-0,5851	Yes	**	0,0014
Veh vs. N	0,1869	No	ns	0,2877
Veh vs. Scr	0,02164	No	ns	0,9081
Veh vs. Clob	-0,8018	Yes	***	0,0003
N vs. Scr	-0,1652	No	ns	0,2648
N vs. Clob	-0,9886	Yes	****	< 0,0001
Scr vs. Clob	-0,8234	Yes	****	< 0,0001

- **Puntaje acumulado (30 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,9301	No	ns	0,0567
- vs. Veh	-1,875	Yes	**	0,0016
- vs. N	0,004372	No	ns	0,9924
- vs. Scr	-0,7776	No	ns	0,1056
+ vs. Veh	-0,9452	No	ns	0,1064
+ vs. N	0,9344	No	ns	0,0863
+ vs. Scr	0,1525	No	ns	0,7700
Veh vs. N	1,880	Yes	**	0,0035
Veh vs. Scr	1,098	No	ns	0,0641
N vs. Scr	-0,7820	No	ns	0,1460

- **Puntaje acumulado (48 h)**

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,7430	Yes	*	0,0260
- vs. Veh	-0,4962	No	ns	0,1564
- vs. N	-0,3143	No	ns	0,3183
- vs. Scr	-0,3747	No	ns	0,2787
- vs. Clob	-1,474	Yes	***	0,0001
+ vs. Veh	0,2469	No	ns	0,5043
+ vs. N	0,4288	No	ns	0,2174
+ vs. Scr	0,3684	No	ns	0,3228
+ vs. Clob	-0,7312	Yes	*	0,0428
Veh vs. N	0,1819	No	ns	0,6217
Veh vs. Scr	0,1215	No	ns	0,7574
Veh vs. Clob	-0,9780	Yes	*	0,0147
N vs. Scr	-0,06039	No	ns	0,8695
N vs. Clob	-1,160	Yes	**	0,0028

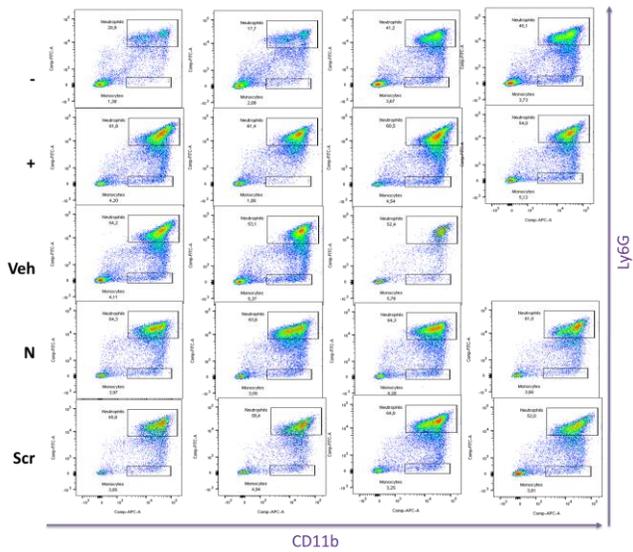
Scr vs. Clob	-1,100	Yes	**	0,0071
--------------	--------	-----	----	--------

7.5. Diagrama de puntos para la citometría de flujo de médula, sangre y bazo.

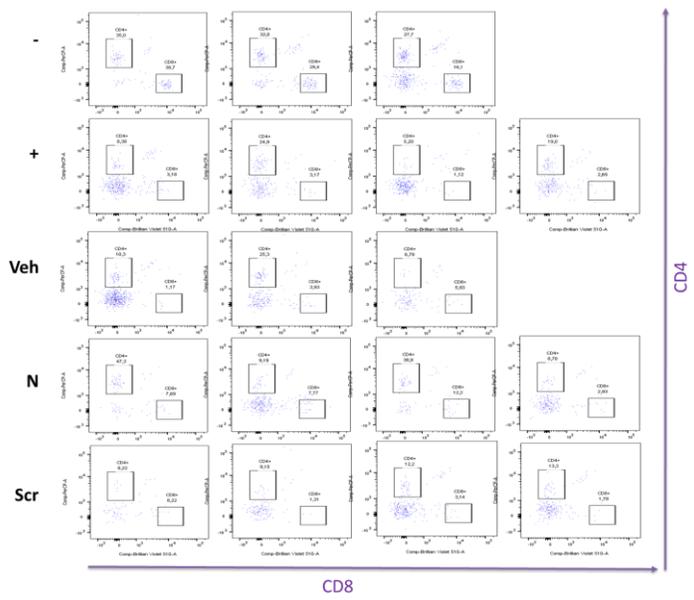
Aplicación del péptido a 30 h del inicio del tratamiento con Imiquimod

- **Médula ósea**

Población CD3-

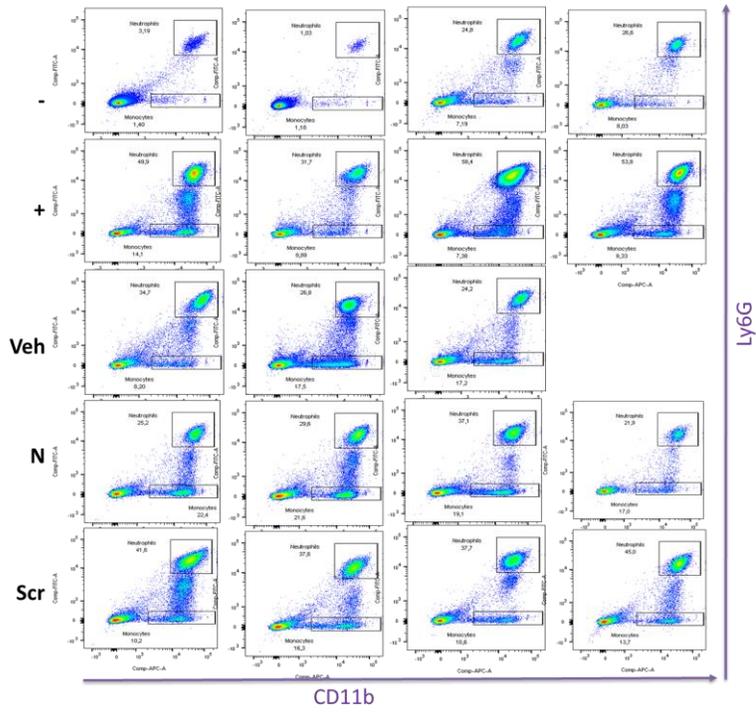


Población CD3+

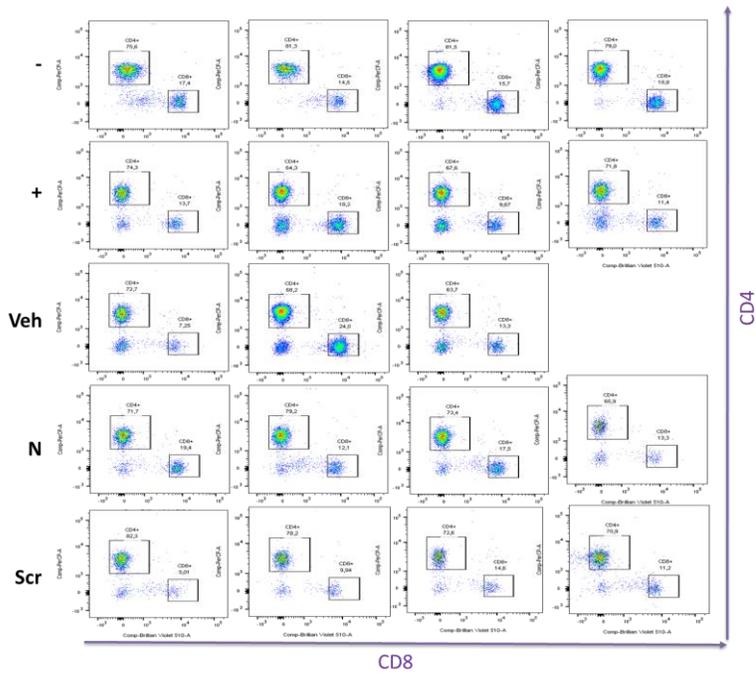


- **Sangre**

Población CD3-

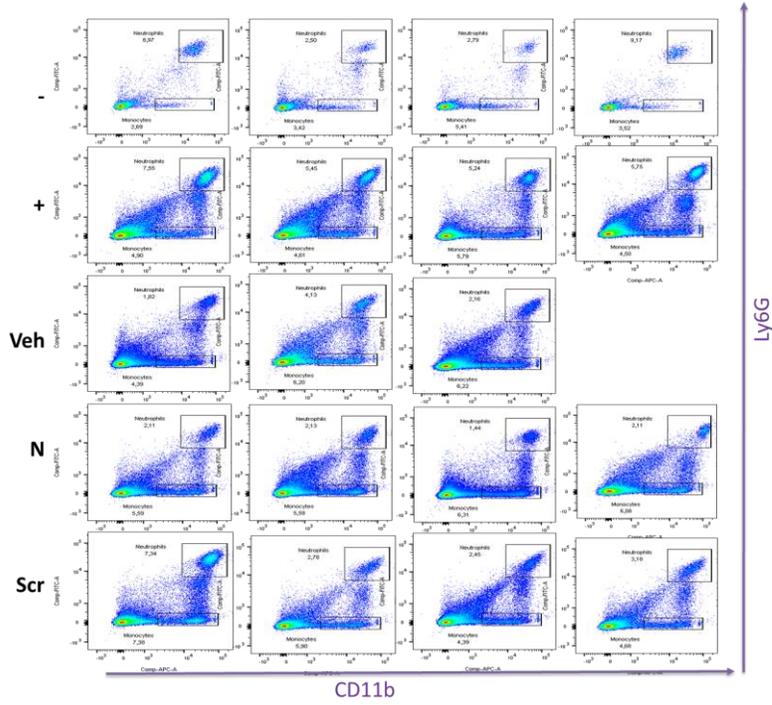


Población CD3+

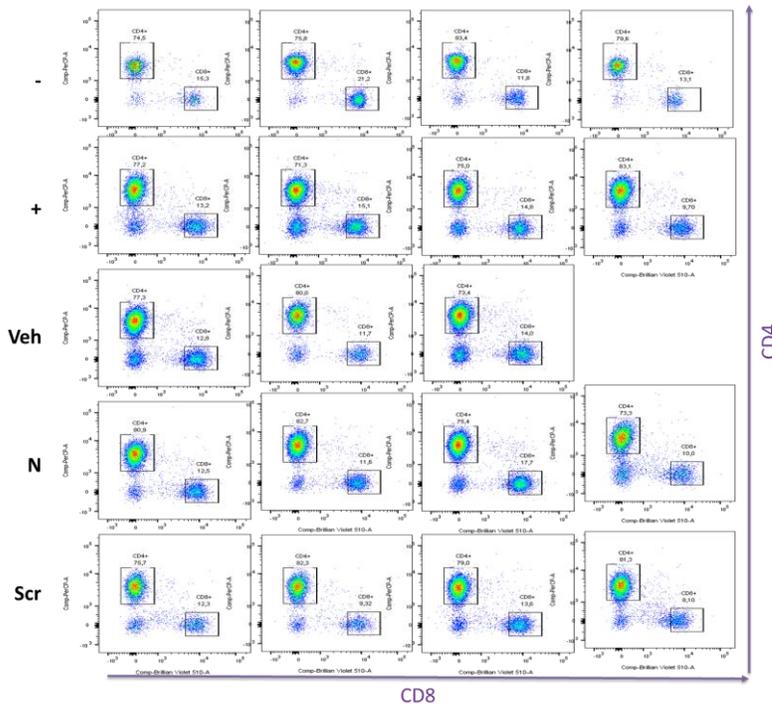


- **Bazo**

Población CD3-



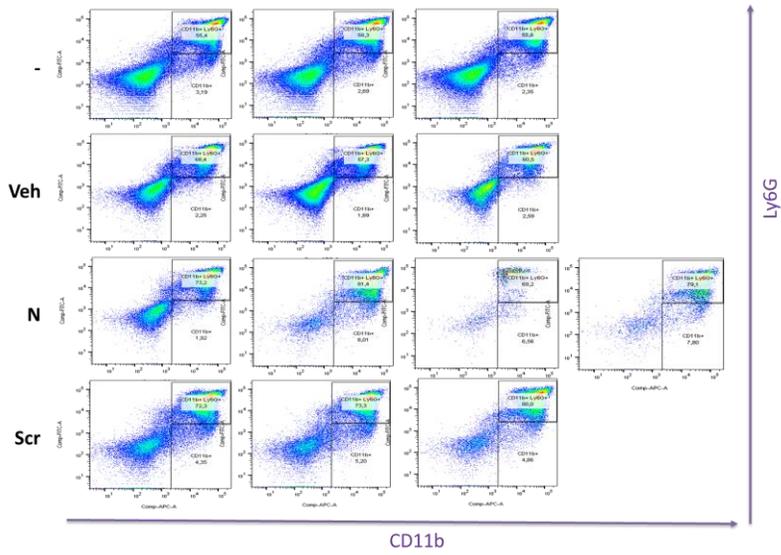
Población CD3+



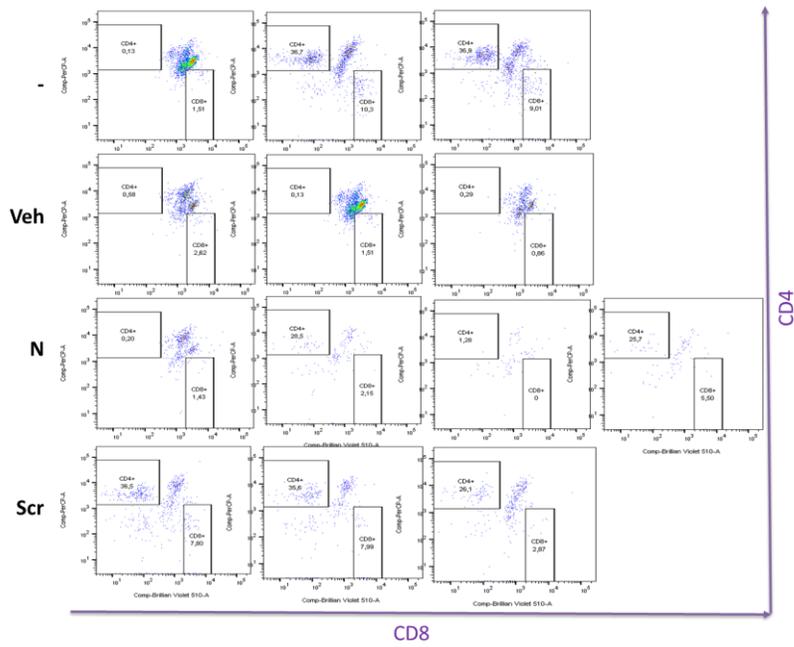
Aplicación del péptido a 30 h del inicio del tratamiento con Imiquimod

- **Médula ósea**

Población CD3-

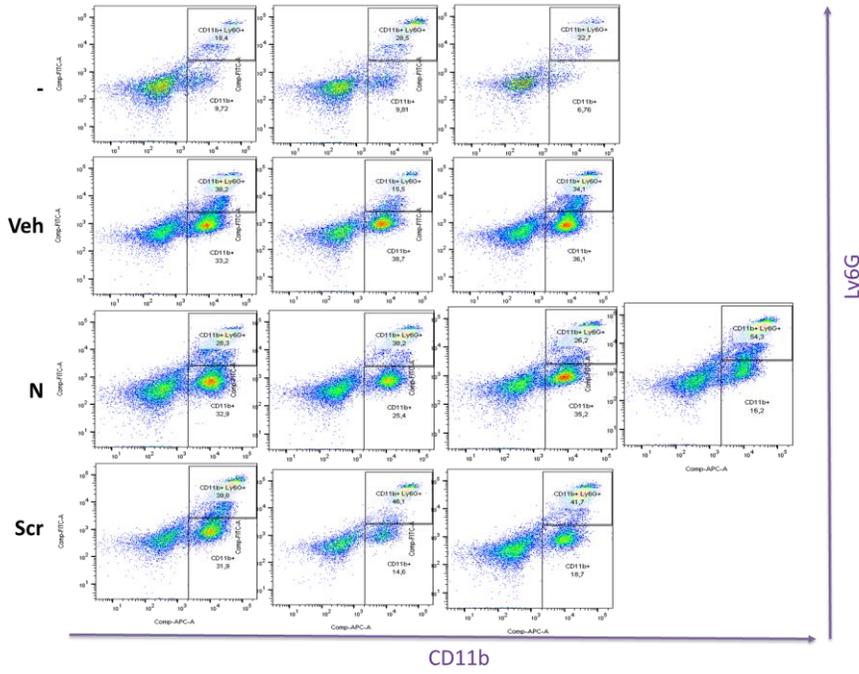


Población CD3+

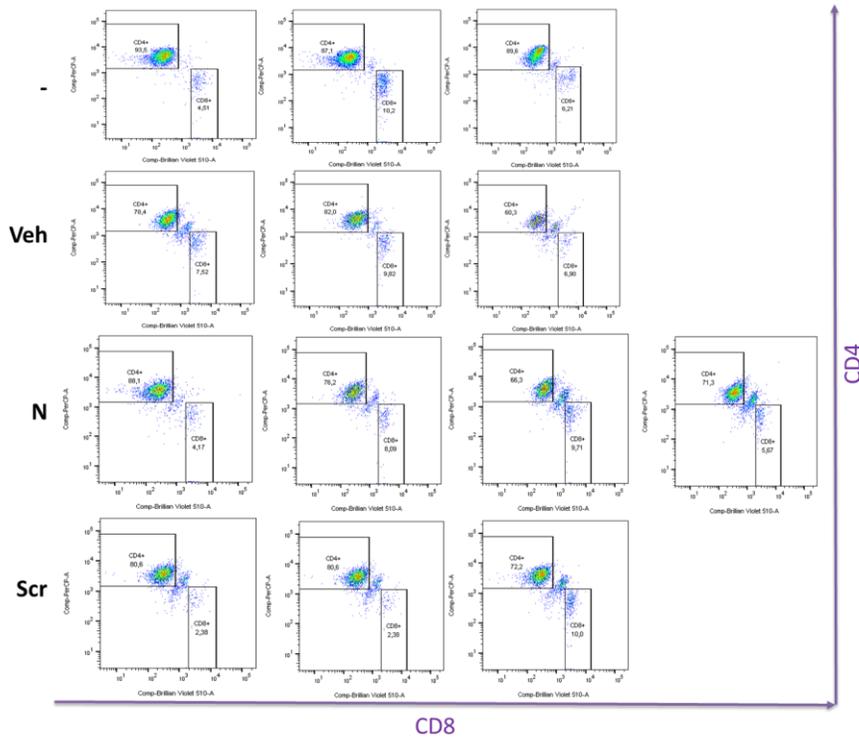


- **Sangre**

Población CD3-

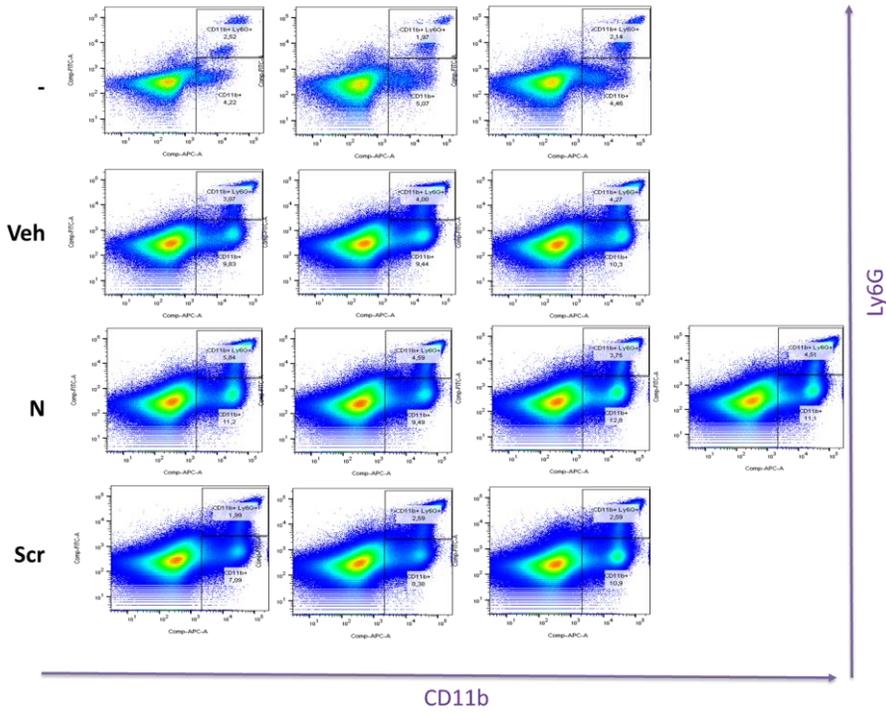


Población CD3+

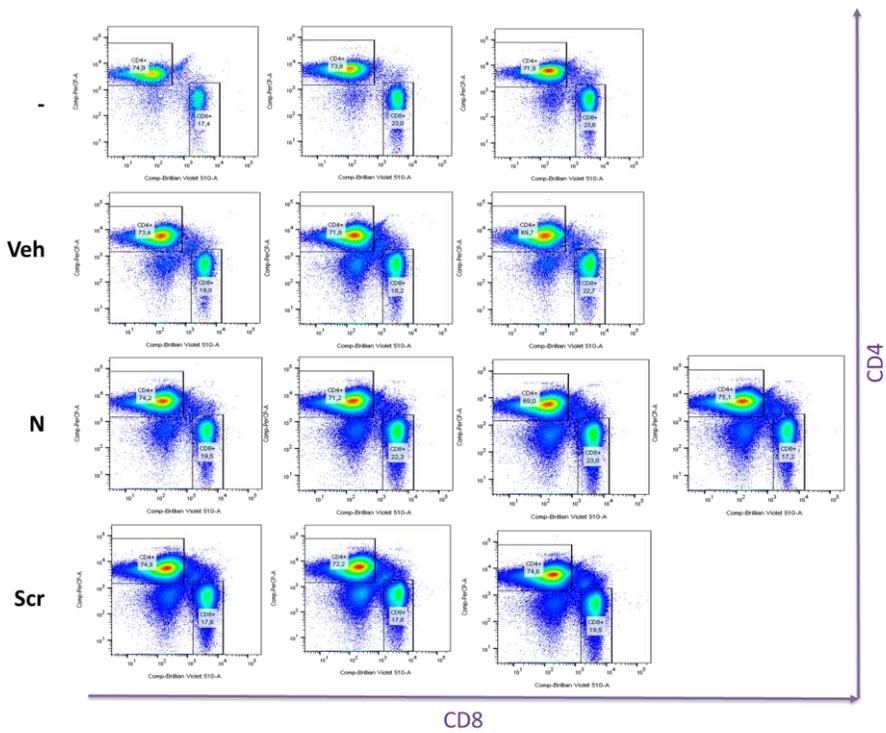


- Bazo**

Población CD3-



Población CD3+



7.6. Matriz de valores p para la Figura 7.11

- 30 h

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,1386	Yes	****	< 0,0001
- vs. Veh	-0,2519	Yes	****	< 0,0001
- vs. N	-0,1836	Yes	****	< 0,0001
- vs. Scr	-0,1661	Yes	****	< 0,0001
+ vs. Veh	-0,1133	Yes	****	< 0,0001
+ vs. N	-0,0450	Yes	*	0,0174
+ vs. Scr	-0,0275	No	ns	0,1259
Veh vs. N	0,06833	Yes	**	0,0018
Veh vs. Scr	0,08583	Yes	***	0,0002
N vs. Scr	0,01750	No	ns	0,3201

- 48 h

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
- vs. +	-0,1386	Yes	****	< 0,0001
- vs. Veh	-0,1986	Yes	****	< 0,0001
- vs. N	-0,1161	Yes	****	< 0,0001
- vs. Scr	-0,1586	Yes	****	< 0,0001
- vs. Clob	0,008929	No	ns	0,6615
+ vs. Veh	-0,06000	Yes	*	0,0441
+ vs. N	0,0225	No	ns	0,3333
+ vs. Scr	-0,0200	No	ns	0,4239
+ vs. Clob	0,1475	Yes	****	< 0,0001
Veh vs. N	0,08250	Yes	**	0,0081
Veh vs. Scr	0,04000	No	ns	0,1878
Veh vs. Clob	0,2075	Yes	****	< 0,0001
N vs. Scr	-0,0425	No	ns	0,0992

N vs. Clob	0,1250	Yes	****	< 0,0001
Scr vs. Clob	0,1675	Yes	****	< 0,0001

8.1. Multiplex de pieles y plasma sanguíneo

Se realizó el análisis de las concentraciones de citocinas inflamatorias descritas en la **sección 6.7.3** para el plasma sanguíneo de los ratones tratados. El análisis de las citocinas provenientes de los explantes de piel solo se realizó para el experimento en el que se inició el tratamiento con los péptidos a las 30 h de haber empezado la aplicación del Imiquimod. Se muestran sólo aquellas citocinas que mostraron tener niveles detectables en al menos uno de los tratamientos experimentales.

