

**Evaluación del papel de la testosterona  
en un modelo murino de dermatitis  
psoriasiforme**

**Tesis entregada a la Universidad De Chile  
en cumplimiento parcial de los Requisitos  
para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por Fabiola Otárola**

**Abril, 2022**

**Directora de Tesis: Dra. Verónica Palma Alvarado**

**Co-Directora de Tesis: Dra. Daniela Sauma Mahaluf**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Fabiola Andrea Otárola Raihuanque

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

16 de Abril de 2022

Director de Tesis:

Dra. Verónica Palma Alvarado

Co-Director de Tesis

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Rosa Bono

Dr. Elías Utreras

"Valar Morghulis"-Game of Thrones

## Biografía



Nací en los últimos días de primavera del año 93, un viernes 17 de diciembre, siendo la hija mayor de lo que serían en el futuro 3 hermanos. Mi etapa escolar se desarrollo en el colegio Los Nogales, tiempo en el cual desarrolle mi gusto por el anime, la música y las manualidades. En un principio mi ser de básica tenia como meta entrar a medicina, pero luego me di cuenta de que lo que me apasionaba y me interesaba enormemente era la ciencia, estudiar y hacer investigación. Es así como termine estudiando Licenciatura en Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En esta carrera se acrecentó mi interés por la biología, específicamente por la biología del desarrollo, laboratorio en el que inicié mis actividades de investigación con el Doctor Juan Fernández, luego de su fallecimiento fui aceptada en un nuevo laboratorio de biología del desarrollo bajo la tutela de la Doctora Verónica Palma, encaminando mi futuro próximo a hacer este programa de magíster.

## Agradecimientos

Quiero agradecer a tantas personas que me disculparan si no menciono a alguno, ustedes saben que no por ello son menos importantes en mi corazón. Primero a mí misma, porque fue difícil el trayecto que llevé a cabo, me sentí insegura, sola a veces y muy agobiada con la cuarentena producto de la pandemia. A mi mamá por apoyarme en una carrera y luego un posgrado que es poco conocido y aún así siempre confiar en mí, a mi hermano Simón por ser un hermano infaltable con el que siempre pude divertirme, conversar y comer cosas ricas en los momentos de más estrés. Al Jean por ser un compañero de vida que siempre ha estado apoyando cada una de mis decisiones, acompañando en esta travesía que fue el magíster, escuchándome ensayar, ponerme nerviosa, ansiosa y comprendiendo que a veces solo necesitaba que me escucharan. A mi mejor amiga de la vida, la Kathy, por ser una persona incondicional, que estuvo siempre presente en pensamientos, mensajes y en todos aquellos momentos en los que mas necesite una amiga comprensiva.

Además, quiero agradecer a muchas personas de los laboratorios de Biología del Desarrollo. Al Isaac, por ser un mentor, un amigo y un entusiasta al ayudarme a llevar mis experimentos a cabo, al David por ser un amigo que me acompañó en los inicios de este tema con conocimiento, una que otra conversación y que además se dio el tiempo de ayudarme a llevar a cabo mis experimentos. A la Deb, por ser una buena amiga y estar ahí para mí cuando lo necesite y porque ¡las risas no faltaron! Al Nacho y al Seba, porque a pesar de habernos distanciado desde que comenzó nuestra amistad por allá por el 2012, siempre estuvieron allí. A la Edel, por brindarme su apoyo, conversaciones, animo y convertirse poco a poco en una amiga incondicional. A mis compañeros del lab gracias por el tiempo que dedicaron a mis presentaciones, que nunca fueron cortas. A todos aquellos que pasaron de ser conocidos a considerarlos amigos, les agradezco sus conversaciones, buenos deseos y animo en los días más difíciles (Vale, Seba, Ñiñi, Fito, Delia, Nano, Xime). A Florencio, por siempre tener un momento para conversar y reírnos un rato. Por último, pero no menos importante, gracias a mis tutoras, la profe Vero y Dani, por guiarme en este nuevo universo de conocimiento que resulto ser la psoriasis y la inmunología, creo que ahora se más que cuando comencé, pero solo un poco a mi parecer.

Agradecer también al profe Julio, que me ayudo más de una vez a resolver dudas teóricas y también sobre procedimientos. Al profesor Alexis Parada, por contestar a cada uno de mis correos de consultas. A sci-hub, ya que sin esta página habría terminado en la ruina o no tendría tesis.

## Índice

Biografía .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Índice de Tablas .....	vii
Índice de Figuras .....	viii
Índice de abreviatura .....	x
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Psoriasis: Una enfermedad autoinmune.....	1
1.2 Papel de las células dendríticas en la piel .....	3
1.3 Patogénesis de la psoriasis .....	5
1.4 Modelo de inducción de psoriasis por Imiquimod .....	7
1.5 Andrógenos y modulación de la respuesta inmune .....	8
2. Hipótesis .....	11
2.1 Objetivo General .....	11
2.2 Objetivos Específicos .....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.11 Mantenimiento de los Animales.....	12
3.12 Preparación de individuos para la inducción de dermatitis psoriasiforme .....	12
3.13 Inducción de dermatitis psoriasiforme en un modelo murino mediante la aplicación por Imiquimod.....	13
3.14 Eutanasia y obtención de muestras.....	13
3.15 Evaluación del Índice de severidad de área psoriásica (PASI, del inglés Psoriasis Area Severity Index) .....	14

3.16 Inyección de testosterona.....	15
3.17 Histología de la piel .....	16
Tinción con Hematolixina y Eosina (H&E).....	16
Tinción Tricrómica de Mallory .....	17
3.18 Obtención de DCs a partir de precursores de médula ósea .....	18
3.19 Administración de testosterona y activación de DC.....	19
3.20 Obtención de células desde el bazo .....	20
3.21 Activación de células de bazo .....	20
3.22 Obtención de células desde piel.....	20
3.23 Citometría de flujo de superficie.....	21
3.24 Marcaje de citoquinas intracelulares por citometría de flujo.....	21
3.25 CBA .....	22
3.26 Análisis Estadístico.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Efecto de la testosterona en la diferenciación de DCs derivadas de médula ósea.....	24
4.2 Efecto de la testosterona en la activación de DCs derivadas de médula ósea. ....	25
4.3 Efecto de la testosterona en la producción de TNF- $\alpha$ e IL-12 por parte de las DCs derivadas de médula ósea. ....	29
4.4 Evaluación del potencial rol inmunomodulador de la testosterona en las lesiones de dermatitis psoriasiforme. ....	32
4.5 Evaluación del potencial rol inmunomodulador de la testosterona en las características morfológicas de la piel en la psoriasis.....	35
4.6 Efecto de la testosterona en la masa corporal y en bazo.....	38
4.7 Fenotipificación de las poblaciones Th1 y Th17 en bazo.....	40
4.8 Efecto de la testosterona en la población de células dendríticas de la piel. ....	45
4.9 Efecto del estrés sobre la inducción de dermatitis psoriasiforme. ....	48
6. CONCLUSIÓN.....	61
7. Proyecciones.....	62
8. BIBLIOGRAFÍA.....	64
9. Anexos .....	75

## Índice de Tablas

Tabla I. Resumen condiciones experimentales



## Índice de Figuras

Figura 1. Fisiopatología de la psoriasis.

Figura 2. Escala PASI adaptada a modelo murino.

Figura 3. La administración de testosterona (1mg/50uL) no produce cambios en la diferenciación de precursores de DC en cultivo.

Figura 4. La administración de Testosterona *in vitro* no modifica la expresión de marcadores de activación ni la producción de citoquinas por las DCs.

Figura 5. La administración de Testosterona *in vitro* no modifica la cantidad de DCs productoras de TNF- $\alpha$  o IL-12.

Figura 6. La evolución de las características psoriásicas medidas como PASI y grosor de piel no es diferente entre los individuos psoriásicos tratados con testosterona y el control.

Figura 7. Las características morfológicas de la piel con psoriasis no son modificadas producto del aumento de la testosterona.

Figura 8. El aumento de la vascularización en individuos psoriásicos no se ve afectada producto de un aumento de la testosterona.

Figura 9. La testosterona no tiene efecto en la masa corporal de los individuos ni en el largo o celularidad del bazo.

Figura 10. La testosterona no tiene efecto en el porcentaje de células CD4+ o CD8+.

Figura 11. La testosterona no tiene efecto en la producción de citoquinas IL-17 e IFN por parte de las células CD4+ y CD8+.

Figura 12. La testosterona no provoca cambios en el perfil de las poblaciones de DC, pero estaría produciendo un cambio en la secreción de citoquinas presentes en la piel.

Figura 13. El estrés exagera la dermatitis psoriasiforme.

Figura 14. Propuesta modelo acción de la testosterona en la enfermedad de psoriasis.

Figura 15. Comparación de la evolución de las características psoriásicas medidas como PASI y grosor de piel entre los individuos psoriásicos hembra y macho de la misma edad.

Figura 16. Comparación de la evolución de las características psoriásicas medidas como PASI y grosor de piel entre los individuos psoriásicos machos de diferente edad.

## Índice de abreviatura

<b>AMP</b>	Péptidos antimicrobiales (del inglés: <i>Antimicrobial Peptides</i> )
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno (del inglés: <i>Antigen-Presenting Cell</i> )
<b>AR</b>	Receptor de andrógenos (del inglés: <i>Androgen Receptor</i> )
<b>BMDC</b>	Células dendríticas derivadas de médula ósea (del inglés: <i>Bone Marrow Dendritic Cell</i> )
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>cDC</b>	Célula dendrítica convencional (del inglés: <i>Conventional Dendritic Cell</i> )
<b>DC</b>	Célula dendrítica (del inglés: <i>Dendritic Cell</i> )
<b>DDC</b>	Célula dendrítica dermal (del inglés: <i>Dermal Dendritic Cell</i> )
<b>DPS</b>	Dermatitis psoriasiforme
<b>FCS</b>	Suero Fetal Bovino (del inglés: <i>Fetal Calf Serum</i> )
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés: <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i> )

<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y Eosina
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleuquina (del inglés: <i>Interleukin</i> )
<b>IMF</b>	Intensidad Media de Fluorescencia
<b>IMQ</b>	Imiquimod
<b>LC</b>	Célula de Langerhans (del inglés: <i>Langerhans Cell</i> )
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés: <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>Mo-DC</b>	Célula dendrítica derivada de monocito (del inglés: <i>Monocyte Derived Dendritic Cell</i> )
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino (del inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>pDC</b>	Célula dendrítica plasmacitoide (del inglés: <i>Plasmacytoid Dendritic Cell</i> )
<b>PMA</b>	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrón (del inglés: <i>Pattern Recognition Receptors</i> )
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
<b>ssRNA</b>	ARN monocatenario (del inglés: <i>Single Stranded RNA</i> )
<b>Tc</b>	Linfocito T citotóxico

- TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (del inglés: *Transforming Growth Factor*)
- Th** Linfocito T "helper" (del inglés: *T helper Cells*)
- TLR** Receptor de tipo Toll (del inglés, *Toll Like Receptor*)
- TNF- $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (del inglés: *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

## RESUMEN

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica de la piel que afecta del 2 al 3% de la población adulta mundial. Diferentes componentes del sistema inmune innato y adaptable, incluyendo células dendríticas activadas, inician el cuadro inflamatorio. Células T y citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$ , entre otras, mantienen la inflamación. Actualmente, los tratamientos para esta condición no son satisfactorios para los pacientes, por lo que múltiples esfuerzos apuntan al estudio de mecanismos moleculares en los cuales se pueda basar el desarrollo de futuros tratamientos. Entre estos, destaca la existencia de un potencial efecto inmunomodulador de la testosterona. En particular, en hombres con hipogonadismo y psoriasis, se ha descrito que la administración de testosterona tendría un rol en la mejoría de las placas psoriásicas, advirtiendo una disminución de las lesiones en la piel. En esta investigación se indagó el rol inmunomodulador de la testosterona en la inflamación inducida por Imiquimod en un modelo murino. Estos experimentos se complementaron con ensayos realizados en cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea como modelo *in vitro*. Los resultados obtenidos del cultivo de células dendríticas indican que la testosterona no ejercería un rol en los niveles de diferenciación y activación de estas células, pero si es posible observar una tendencia en la producción de la citoquina IL-12, que

aumenta producto de la testosterona, citoquina implicada en la activación de las células T vírgenes. Por otro lado, en el modelo *in vivo* se observó que el índice de severidad de área corporal (índice PASI) no es diferente en aquellos ratones tratados con testosterona en comparación con los controles. Los análisis por citometría de flujo del porcentaje de las poblaciones de células dendríticas de piel tampoco arrojan diferencias entre el grupo control y los tratados con testosterona. En el bazo, órgano linfoide secundario que tiene un papel importante en la expansión de los linfocitos, se obtuvo un resultado similar al comparar el porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8 presentes en este órgano. Además, los resultados muestran que no hay diferencias ni en la secreción ni en la producción de varias citoquinas involucradas en la enfermedad. Dado estos resultados, se propone estudiar otras poblaciones celulares tales como los queratinocitos y evaluar si la secreción de citoquinas en éstos es afectada por la testosterona.

## ABSTRACT

Psoriasis is a chronic, inflammatory autoimmune skin disease that affects 2-3% of the adult world population. Different components of the innate and adaptative immune system are involved in this condition, including active dendritic cells, whose activity initiates the inflammatory response. T cells and cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$ , among others, sustain the inflammation over time. Although treatments for this disease exist at the present, they are not satisfactory for patients. Therefore, multiple efforts are currently underway aiming to explain the molecular mechanisms, and generate information which could be used to develop further treatments. Among these, the existence of a potential immunomodulatory effect of testosterone highlights. Particularly, it has been described that testosterone administration could improve psoriatic plaques in men with hypogonadism and psoriasis, revealing a decrease of skin injuries. This work inquires the immunomodulatory role of testosterone in an Imiquimod-induced psoriasiform-like dermatitis mouse model. Bone marrow-derived dendritic cells were used as an *in vitro* model, complementing the *in vivo* experiments. Dendritic cell culture results show that testosterone does not impact the levels of dendritic cell differentiation or activation, but an increased IL-12 cytokine production can be observed, which increases by the action of testosterone, cytokine involved in the activation of



naive T cell. The severity index by body area (PASI index) is not different between testosterone-treated animals compared to controls. Furthermore, flow cytometry analyses of percentage of skin dendritic cells reveal no difference between controls compared to testosterone-treated animals. In the spleen, a secondary lymphoid organ that has an important role in the expansion of lymphocytes, we obtained similar results by comparing percentage of TCD4 and CD8 lymphocytes present in this organ. Moreover, results indicate no difference in secretion nor production of cytokines involved in this disease. Given these results, it is proposed to study other cell populations like keratinocytes and assess if their cytokine secretion pattern could be affected by testosterone.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Psoriasis: Una enfermedad autoinmune

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica cutánea que afecta al 2-3% de la población mundial presentando diferentes fenotipos y grados de severidad.

Dentro de los diversos tipos de psoriasis la más común es la "*psoriasis vulgaris*" correspondiendo al 90% de los diagnósticos (Wagner E. y col., 2010; Grine L. y col., 2015; Greb J. y col., 2016; Eltaweel A. y col., 2018). Su histopatología está caracterizada por una proliferación anormal de los queratinocitos, producto de lo cual se observa un engrosamiento epidérmico (acantosis) y dos fenómenos que ocurren en el estrato córneo: engrosamiento (hiperqueratosis) y retención del núcleo por parte de los queratinocitos (paraqueratosis). Además, ocurre una prominente infiltración de células del sistema inmune (linfocitos T, macrófagos y células dendríticas) en la dermis, y, simultáneamente se produce una desregulación de la angiogénesis, observándose un aumento en la cantidad de vasos presentes en la dermis. (Wagner, E. y col., 2010; Gritzner, E. y col., 2014; Ueyama, A. y col., 2014; Greb, J. y col., 2016; Singh, TP. y col., 2019; Jabeen, M. y col., 2020).

Un aspecto clave de la psoriasis es la existencia de una desregulación del sistema inmune. Específicamente, se ha demostrado que una variedad de células del sistema inmune contribuye a la patogénesis de la enfermedad, incluyendo a las células dendríticas (DC, del inglés: *Dendritic Cell*), linfocitos T, mastocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos e incluso los mismos queratinocitos (Wang, A. y Bai, Y., 2020). La activación de las DCs inicia la inflamación en la zona, lugar en donde la constante comunicación entre sistema inmune innato y adaptable produce mediante citoquinas una mantención del cuadro inflamatorio. En primera instancia las citoquinas son producidas por la activación de las DCs iniciando la inflamación local que comprende la diferenciación de los linfocitos vírgenes a linfocitos T helper (Th, del inglés: *T helper Cells*) 17 y la secreción de citoquinas, como interleuquina (IL, del inglés: *Interleukin*) 23 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés: *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), por parte de éstos (eje Th17/IL-23) (Marinoni, B. y col., 2014). La mantención de este cuadro inflamatorio está dada por una variedad de citoquinas: IL-17, IL-22, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  producidas por las células T Gamma-delta ( $\gamma\delta$ ), Th1, Th17, Th22, linfocitos T citotóxicos (Tc) 1 y Tc17 (Marinoni, B. y col., 2014; Teunissen, M. y col., 2014; Volaric, I. y col., 2019).

## 1.2 Papel de las células dendríticas en la piel

Las DCs son conocidas por ser células presentadoras de antígeno profesionales. Estas células tienen la maquinaria para capturar y procesar antígenos que luego presentarán a los linfocitos T vírgenes. Las DCs son una población heterogénea de células que pueden clasificarse en base a su función, localización, marcadores de superficie y factores de transcripción (Segura, E., 2016; Kim, T. y col., 2017). En la piel de individuos sanos encontramos dos subtipos de DC: las células de Langerhans (LC, del inglés: *Langerhans Cells*) y las células dendríticas convencionales (cDCs, del inglés: *Conventional Dendritic Cell*) o dermales. En condiciones de inflamación se hacen presentes otros subtipos de DC como son las DCs derivadas de monocito (Mo-DCs, del inglés: *Monocyte Derived Dendritic Cell*) o DCs inflamatorias (Segura, E., 2016) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs, del inglés: *Plasmacytoid Dendritic Cell*) (Singh, T.P. y col., 2016; Kim, T.G. y col., 2017).

La LC deriva de progenitores de médula ósea y mantiene su ubicación en la epidermis desde antes del nacimiento. Estudios han mostrado que son capaces de mantener su número celular en la piel mediante auto-renovación, además en este mismo lugar tiene la capacidad de capturar antígenos periféricos, proliferar y migrar a los linfonodos periféricos más cercanos iniciando una fuerte respuesta

inmune mediante la presentación antigénica a las células T (Kim, T. y col., 2017). La cDC también deriva de progenitores de médula ósea, están presentes en la región superior de la dermis, tejidos linfoides y no linfoides. Las cDC se dividen en dos poblaciones discretas, cDC1 y cDC2, esta división se basa en la expresión diferencial de marcadores de superficie; estos subtipos también son capaces de migrar al linfonodo periférico más cercano (Kim, T. y col., 2017).

Las DCs expresan un gran repertorio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés: *Pattern Recognition Receptors*). Pueden ser estimuladas por patrones característicos de patógenos, como LPS, así como también por citoquinas inflamatorias, células necróticas y agonistas de Toll-like receptors (TLR) incluyendo al TLR7 y 8. Estos pueden reconocer moléculas de ARN monocatenario (ssRNA, del inglés: *Single Stranded RNA*) producidas por virus y moléculas de RNA endógenas (Bender, A.T. y col., 2020; Langenkamp, A. y col., 2000; Van der Fits, L. y col., 2009). La célula se activa en respuesta a las señales de estos receptores, convirtiéndose en una célula presentadora de antígeno (APC, del inglés: *Antigen-Presenting Cell*) competente, para llevar a cabo la expansión y diferenciación de las células T (Joffre, O. y col., 2008).

### **1.3 Patogénesis de la psoriasis**

Las causas que gatillan la psoriasis son diversas; esta puede ser inducida por varios factores en individuos genéticamente susceptibles como lo son: traumas, infecciones o medicamentos. También se ha descrito que puede ser provocada por factores secretados como péptidos antimicrobiales, citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (citoquinas quimioattractantes), por ello se menciona un origen multifactorial (Greb, J.E. y col., 2016).

Cuando las DCs se activan, producen y secretan TNF- $\alpha$  e IL-23. TNF- $\alpha$  actúa de forma autocrina sobre las DCs, promoviendo su supervivencia y de manera paracrina sobre los linfocitos y queratinocitos activando la vía de señalización de NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) lo que genera un efecto sobre la proliferación y supervivencia. Asimismo, TNF- $\alpha$  actúa de manera paracrina sobre los queratinocitos, estimulando la producción de IL-8 lo que lleva a un reclutamiento de neutrófilos a la zona (Ogawa, E. y col., 2018). Por otro lado, la IL-23 producida y secretada por parte de las DCs regula el desarrollo y la mantención de la población Th17, promoviendo su expansión. Además, existen otros tipos celulares, río debajo de la cascada de señalización, que producen y secretan IL-23, como son los monocitos activados, macrófagos, células T y células B.

Las células Th17 son activadas por las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-23, produciendo IL-17 como consecuencia de la activación. Se sabe que existen otras poblaciones celulares como las Tc17, células T  $\gamma\delta$  y células natural killer que también producen IL-17. Esta citoquina en los queratinocitos promueve la expresión de IL-6 e IL-8 y es importante en el reclutamiento y mantención de los neutrófilos. Por otro lado, las poblaciones de Th17 y Th22 producen la citoquina IL-22 que actúa sobre los queratinocitos aumentando su proliferación. Se genera así un ciclo de inflamación que no puede ser controlado y, por lo tanto, se mantiene en el tiempo.

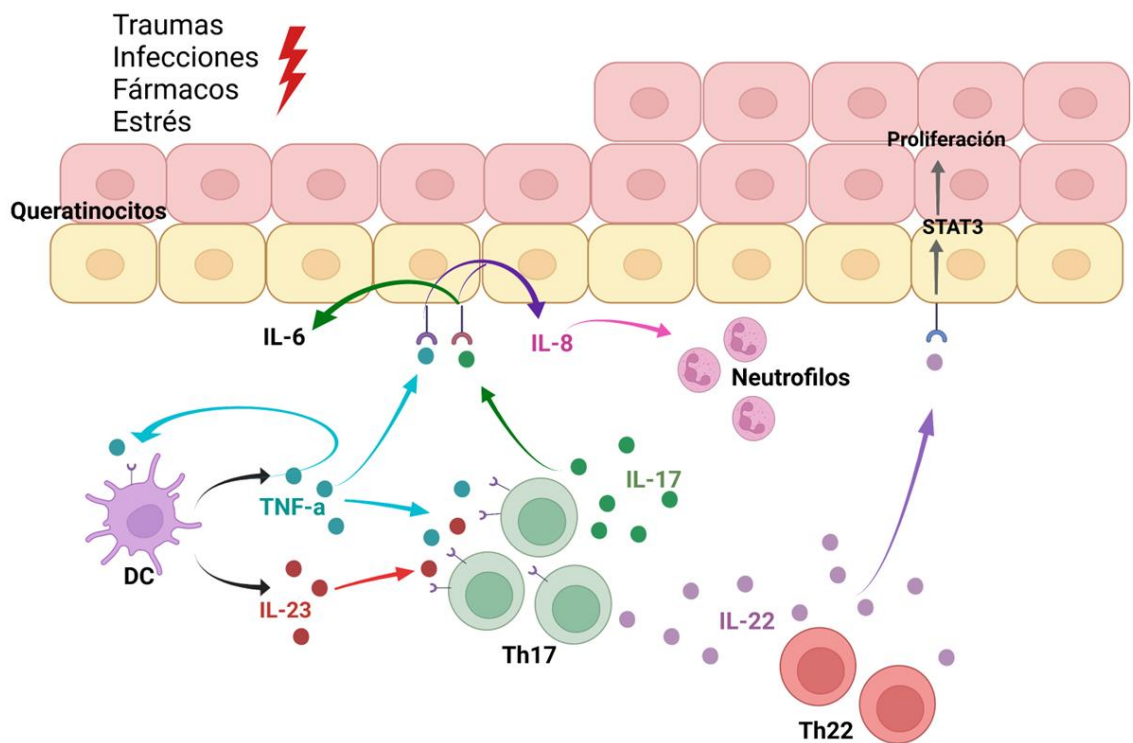


Figura 1. **Fisiopatología de la psoriasis.** La psoriasis puede ser gatillada por traumas, infecciones, fármacos, estrés, entre otros. El inicio del cuadro inflamatorio ocurre por la activación de la DC, que secreta TNF- $\alpha$  e IL-23, en donde TNF- $\alpha$  actúa de forma autocrina y paracrina sobre los queratinocitos, provocando en estos la producción de IL-8 que

reclutará neutrófilos a la zona. Por otro lado, la IL-23 actúa sobre los linfocitos Th17 provocando su expansión y producción de IL-17 e IL-22, esta última producida además por los Th22. La IL-17 actúa sobre los queratinocitos provocando en estos la producción de IL-6 e IL-8. La IL-22 ejerce su acción sobre los queratinocitos aumentando su proliferación, lo que se conoce en la psoriasis como una proliferación desregulada. Esquema generado en Biorender basado en Ogawa y colaboradores y Sun y colaboradores (Ogawa, E. y col., 2018; Sun, S. y col., 2019).

#### **1.4 Modelo de inducción de psoriasis por Imiquimod**

El Imiquimod (IMQ) es un agonista sintético de TLR 7 y 8 que es usado como tratamiento tópico de verrugas genitales y perianales causadas por el virus del papiloma, queratosis actínica y carcinoma basocelular superficial (Van der Fits, L. y col., 2009; El Malki, K. y col., 2013; Ueyama, A. y col., 2014). En ratones, la aplicación tópica de IMQ puede producir una inflamación de la piel tipo psoriasis, caracterizada por eritema, acantosis, infiltrado celular y angiogénesis desregulada (Van der Fits, L. y col., 2009; Ueyama, A. y col., 2014; Onderdijk, A. y col., 2017; Fenix, K. y col., 2020; Jabeen, M. y col., 2020).

En el modelo de inducción de dermatitis psoriasiforme se sabe que las células que gatillan la enfermedad son aquellas que poseen el receptor de TLR7 y/u 8, y es precisamente su activación lo que da inicio al desarrollo de la enfermedad. El IMQ activa subtipos de DC presentes en la piel entre las que se encuentra la LC y la cDC, éstas migran al órgano linfoide más cercano en donde realizan la presentación antigénica (Suzuki, H. y col., 2000; Schön, M. p. y



Schön, M., 2007; Kim, T. y col., 2017). Adicional a la migración hay una inducción de citoquinas como IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-22 e IL-23, recapitulando lo que sucede en humanos (Suzuki, H. y col., 2000; Dahl, M., 2002; Ogawa, E. y col., 2017).

### **1.5 Andrógenos y modulación de la respuesta inmune**

Desde el siglo pasado se conoce que las hormonas sexuales tienen efectos en el sistema inmune (Ahmed, S. y col., 1985). En particular se han demostrado las propiedades antiinflamatorias de la testosterona en varios modelos de enfermedades, como la encefalomiелitis autoinmune, la miastenia gravis, la diabetes y la enfermedad coronaria (Traish, A. y col., 2018). En la última década, se han reportado algunos casos en que hombres (en edad reproductiva activa) con "*psoriasis vulgaris*" presentan un aumento en los niveles de estradiol y disminución en los niveles de testosterona en comparación con individuos sanos (Cemil, B. y col., 2015; Eltaweel, A. y col., 2018). En un estudio piloto se reportó que hombres hipogonadales, que además presentaban psoriasis, al ser tratados para su hipogonadismo con terapia de reemplazo de testosterona durante un período de casi 8 años, mostraron una mejoría clínica significativa en cuanto al área afectada de psoriasis (PASI) (Saad, F. y col., 2016). Además, un estudio reciente reportó que los niveles de testosterona bajos

estarían en estrecha relación con la severidad de la psoriasis (Allam, JP. y col., 2019).

En línea con lo anterior, la investigación de Chen y colaboradores ha mostrado que la administración de testosterona en un cultivo de esplenocitos de rata, provoca una disminución en la secreción de TNF- $\alpha$  y óxido nítrico de manera dosis dependiente (Chen, C. y col., 2016). Adicionalmente, en otras investigaciones se ha observado que produce un cambio de respuesta Th1 a Th2 mediante la reducción de la secreción de TNF- $\alpha$  o IL-6, inhibición en la proliferación de células T y apoptosis de estas células (Traish, A. y col., 2018). También se ha reportado que la terapia de reemplazo de testosterona en hombres hipogonadales, disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  (Kalinchenko, S. y col., 2010).

Respecto a la posible respuesta hormonal del sistema inmune, se ha identificado que los linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos (Traish, A. y col., 2018) y DC (Thompson, M. y col., 2017) poseen receptores de andrógeno (AR, del inglés: *Androgen Receptor*). Sin embargo, a la fecha, no se han realizado estudios que permitan relacionar el efecto de la testosterona en el desarrollo o progresión de la psoriasis por lo que se desconoce el rol que tendría en la patogenia.

Se conoce que la testosterona tiene acción sobre ciertos componentes del sistema inmune. Tanto en pacientes, como en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que al tratar

con testosterona hay una disminución en los niveles de algunas citoquinas pro-inflamatorias. Una de estas citoquinas, TNF- $\alpha$ , se produce tempranamente en la enfermedad de psoriasis. Por lo anteriormente expuesto es que, el objetivo de esta investigación es observar el potencial efecto inmunomodulador de la testosterona en las DCs, como principales productoras de TNF- $\alpha$ , y en otras células efectoras del sistema inmune que son claves en la enfermedad.

## **2. Hipótesis**

La testosterona actúa como factor protector en el desarrollo de la dermatitis psoriasiforme, disminuyendo la producción de TNF- $\alpha$  en células dendríticas en un modelo murino.

### **2.1 Objetivo General**

Caracterizar el rol protector de la testosterona en el modelo murino de dermatitis psoriasiforme inducido por Imiquimod y analizar si dicho papel es mediado por una reducción en la producción de TNF- $\alpha$  de parte de las células dendríticas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- i. Evaluar el efecto de la testosterona en la diferenciación, activación y producción de TNF- $\alpha$  por parte de la población de células dendríticas.
- ii. Evaluar si la testosterona disminuye las características morfológicas de la piel y órganos clave en un modelo murino de dermatitis psoriasiforme tratado (tales como aumento de vasos sanguíneos, presencia de células inflamatorias productoras de IL-17 y TNF- $\alpha$ ).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.11 Mantenición de los Animales**

En este trabajo se utilizaron ratones macho y hembra *Mus musculus* adultos (Clase: Mammalia, Orden: Rodentia, Familia: Muridae, Cepa: BALB/c), 12-14 semanas y 5 meses de edad, respectivamente. Todos los ratones fueron mantenidos dentro de un ambiente a temperatura controlada, con alimentación *ad libitum* (prolab RMH 3000 de labDiet), con ciclo día/noche de 12 y 12 horas, en bioterio propio y autorizado, mantenido por personal calificado. Protocolo CICUA autorizado (Código CICUA 19324 - FCS - UCH).

Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC, del inglés: *Bone Marrow Dendritic Cell*) se obtuvieron de ratones hembra y los experimentos de inducción de dermatitis psoriasiforme se llevaron a cabo utilizando machos (26-28 g).

#### **3.12 Preparación de individuos para la inducción de dermatitis psoriasiforme**

El proceso de depilación se realizó bajo anestesia por isoflurano. El proceso de anestesia comenzó con la sedación del individuo en una cámara de gases con 0,5 L/min de oxígeno y 2-2,5% de isoflurano, posterior a esto se trasladó el ratón a una camilla

térmica con una boquilla a la cual se redirigió el flujo que previamente se dirigía a la cámara de gas. Mientras el individuo estaba sedado se afeitó con rasuradora eléctrica un cuadrante de aproximadamente 3 x 5 cm del dorso y luego para eliminar el pelaje corto remanente se aplicó crema depilatoria (Veet piel sensible) por tres minutos. Pasado el tiempo se extrajo la crema con un cepillo con agua y se secó el dorso del ratón con toalla de papel para evitar alguna reacción alérgica.

### **3.13 Inducción de dermatitis psoriasiforme en un modelo murino mediante la aplicación por Imiquimod**

Para la inducción se mantuvieron los ratones en jaulas individuales con sustrato de papel peletizado (Animal Care). Se aplicaron 62,5 mg de crema Imiquimod 5% (IMQ) o vehículo (vaselina) sobre el dorso del animal depilado siempre a la misma hora (1 p.m.) por seis días consecutivos.

Se realizó registro fotográfico y de masa corporal de los ratones previo a la aplicación de IMQ o su vehículo.

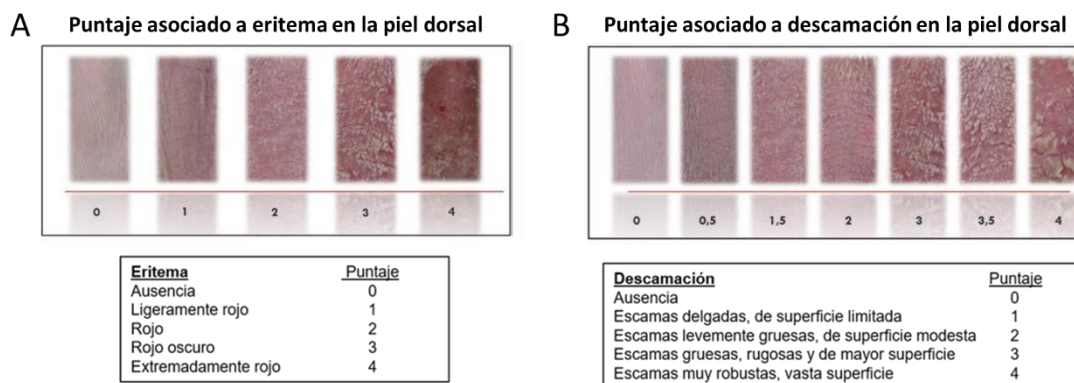
### **3.14 Eutanasia y obtención de muestras**

Se utilizó isoflurano para la eutanasia de los ratones al día siete de iniciado el tratamiento. Esta se realizó mediante

vaporizador con una dosis única (concentración 5%) por tres a cinco minutos, hasta que se observó el cese de la respiración, luego de lo cual se colectaron muestras de piel (trozo de 2x2cm) que continuaron el protocolo de obtención de células desde la piel, un Punch de biopsia que se utilizó para medir citoquinas (CBA) y un trozo de 1x2cm que se utilizó en protocolo histología de piel y bazo.

### **3.15 Evaluación del Índice de severidad de área psoriásica (PASI, del inglés Psoriasis Area Severity Index)**

Se realizó la medición de PASI adaptado a un modelo murino (Onderdijk, A.J. y col., 2017) para evaluar el efecto de la administración de testosterona (1,0mg/50µL). El PASI es un indicador clínico de la psoriasis (Cemil, B. y col. 2015; Saad, F. y col. 2016; Eltaweel, A. y col 2018) y es una herramienta útil que se usa para monitorear el progreso de la inflamación psoriásica en los animales (Onderdijk, A.J. y col., 2017), de aquí en adelante mencionada como dermatitis psoriasiforme. Esta examinación fue realizada de manera visual considerando dos parámetros: eritema y escamas. Cada parámetro tiene una puntuación de 0-4 detallada en el paper de Onderdijk (Figura 2).



**Figura 2. Escala PASI adaptada a modelo murino.** A. Se muestra el puntaje clínico asociado al nivel de eritema en dermatitis psoriasiforme. B. Se muestra puntaje clínico asociado a nivel de descamación en dermatitis psoriasiforme (Onderdijk, A.J. y col., 2017).

Para este análisis se consideró además evaluar si el sexo o edad era relevante en el índice PASI (Figura 15 A, B y D; Figura 16 A, B y D respectivamente). Adicional al PASI se midió el grosor de piel, mediante un pie de metro, que mide en mm el grosor de piel. Para tener un valor más certero del grosor de la piel se midió cada día antes de la aplicación de IMQ en cinco puntos del dorso del animal y estos valores fueron promediados para obtener el grosor de piel diario. Para este análisis también se consideró evaluar si el sexo o edad era relevante (Figura 15C y 16C, respectivamente).

### 3.16 Inyección de testosterona

Los ratones fueron inyectados intramuscularmente con una dosis única de 1,0mg/50µL de testosterona enantato (Ethon Pharmaceuticals) en la pata posterior derecha o con 50 µL de aceite



de ricino como vehículo (259853; Sigma-Aldrich); lo anterior fue efectuado con una jeringa de 1 mL, aguja 25 x g.

### **3.17 Histología de la piel**

Las muestras de piel se fijaron en formalina tamponada al 10% por dos horas, luego se pasaron por: cinco baños de PBS (10 minutos c/u), alcohol etílico 50% (en PBS)-70-80-90-95% (en agua) (30 minutos c/u), etanol absoluto por una hora, tres baños de Neoclear (xilol) (30 minutos c/u), parafina:xilol 1:1 por 1-2 horas y por último dos baños de parafina pura, luego de lo cual se traspasaron a bloques de inclusión, se agregó parafina y se dejó solidificar.

Utilizando un microtomo (Leica RM2125 RTS) se obtuvieron cortes seriados de 7 o 10  $\mu\text{m}$  de grosor, que fueron depositados en portaobjetos xilanizados.

Tinción con Hematolixina y Eosina (H&E)

Los cortes de 7 o 10  $\mu\text{m}$  fueron tratados con: tres baños de Neoclear (xilol) (10 minutos c/u), dos de alcohol etílico 100% (10 y 20 minutos), alcohol etílico 90-75% (en agua) (1 minuto c/u), alcohol etílico 50% (en agua) por dos minutos y agua destilada. La tinción fue realizada adicionando hematoxilina 50% por 1-2 minutos, se lavó con agua destilada, luego se adicionó eosina al 10% por 0,5-1 minuto, se lavó con agua destilada. Luego los portaobjetos se pasaron por: alcohol etílico 50% por 30 segundos,

70% por un min, 90 % por 30 segundos, etanol absoluto por un minuto y Neo-Clear (xilol) (2-3 minutos c/u), Neo-Clear puro por cinco minutos, por último, se le colocaron 2 gotas de Entellan (Merck), se colocó cubre objeto y se dejó secar por 12 horas. Las muestras fueron observadas en microscopio de fluorescencia BX51 (OLYMPUS, EE. UU).

#### Tinción Tricrómica de Mallory

Los cortes de 7 µm fueron tratados con: baños de etanol 70%-50%-25% (en agua) por 10 minutos cada uno, mordantados en solución saturada de Cloruro de Mercurio II acuoso (HgCl<sub>2</sub>) por 10 minutos, enjuagados con agua destilada. La tinción fue realizada adicionando Fucsina Ácida 0,5% por 15 segundos, se lavó con agua destilada, luego se adicionó ácido fosfomolibdico al 2% por un minuto, se lavó con agua destilada, por último, se adicionó una solución de 4 partes de Orange G: 4 de ácido oxálico: 1 de aniline Blue por un minuto, se lavó con agua destilada. Luego los portaobjetos se pasaron por etanol 90% por 10 segundos y dos veces por etanol 100% por dos segundos. Por último, se le agregaron dos gotas de Entellan (Merck), se colocó cubreobjeto y se dejó secar por 12 horas. Las muestras fueron observadas en microscopio de fluorescencia BX51 (OLYMPUS, EE. UU).

### **3.18 Obtención de DCs a partir de precursores de médula ósea**

Una vez eutanasiado el ratón, se removieron las extremidades posteriores y se eliminó la piel, músculo y grasa. Luego se separó la tibia del fémur y los huesos se depositaron en una placa con PBS, en hielo. Para esterilizar los huesos, estos se traspasaron a una placa con etanol 70 % por un minuto bajo campana, luego de lo cual se recibieron en una placa nueva con RPMI sin suero. Se cortaron los extremos de los huesos y se perfundió la médula con medio RPMI sin suero utilizando una jeringa de 10 mL con una aguja de 25x g. La médula ósea se recibió en un tubo de 50 mL y luego se disgregó agitando el tubo empleando un vortex. La suspensión se centrifugó a 600 g por siete minutos y se resuspendió en dos mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (Biolegend) por cinco minutos. La lisis se finalizó agregando 18 mL de RPMI sin suero. La suspensión celular se centrifugó nuevamente a 600 g por siete minutos y luego se contó el número de células vivas utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripán.

La suspensión celular se resuspendió  $1-1,5 \times 10^6$  cel/mL en medio RPMI +10% FCS + 10 ng/mL de GM-CSF. Las células se incubaron en placas P24 ( $1-1,5 \times 10^6$  células por pozo) por 6 días en una incubadora al 5% de CO<sub>2</sub>. Al día dos y cuatro se aspiró parte del medio (cerca de 900 µL) utilizando una pipeta pasteur y se agregó un mL de medio fresco (RPMI + 10% FCS + 10 ng/mL de GM-CSF) por pozo teniendo cuidado de no generar turbulencias en la placa. Al día seis, las

células se sacaron de la placa utilizando una pipeta y el porcentaje de DCs se calculó en base a la expresión de la integrina CD11c por citometría de flujo.

### 3.19 Administración de testosterona y activación de DC

La testosterona en polvo (86500; Sigma-Aldrich) se disolvió en etanol absoluto (grado Biología molecular) para generar un stock con una concentración 10 mM (lo anterior se realizó bajo campana y oscuridad). Cuando se agregó el stock de testosterona en el cultivo esta quedó con una concentración de 10  $\mu$ M y el etanol quedó al 0,1% durante la diferenciación y/o activación de las células dendríticas. La testosterona fue adicionada desde el inicio del proceso de diferenciación de DC y luego durante la activación según lo indicado en la tabla I. Los cultivos de DC se activaron por 4 horas con agonista de TLR7 (R848, 0,3 $\mu$ g/mL) + Brefeldina A (5 $\mu$ g/mL) (Sigma).

**Tabla I: Resumen de condiciones experimentales.**

Condición	Testosterona	
	Diferenciación	Activación
ST	-	-
TA	-	+
TDA	+	+

ST: sin testosterona; TA: testosterona en activación; TDA: testosterona en diferenciación y activación.

### **3.20 Obtención de células desde el bazo**

El bazo se perfundió con 10 mL RPMI utilizando una jeringa de 10 mL y una aguja de 25 x g. La suspensión se traspasó a tubo centrifugación de 15 mL y se centrifugó a 600 g por siete minutos. El pellet se resuspendió en dos mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (Biolegend) por cinco minutos en hielo, luego de lo cual se agregaron 10 mL de RPMI +10%FCS. La suspensión se centrifugó nuevamente a 600 g por siete minutos y se resuspendió en 10 mL de RPMI + 10%FCS para contar las células vivas empleando una cámara Neubauer y azul de tripán.

### **3.21 Activación de células de bazo**

Se colocaron 2-3 x10<sup>6</sup> células/mL en un tubo de centrifugación de dos mL, se centrifugaron a 600 g por siete minutos a 4°C. Las células se incubaron a 2 x 10<sup>6</sup> células/mL en RPMI + 10% FCS, en presencia de PMA 25 mM (Sigma), Ionomicina 1 µg/mL (Sigma) y 10 µg/mL Brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences) por cuatro horas en un incubador a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>. Luego de esto se continúa con el protocolo de citometría de flujo de superficie.

### **3.22 Obtención de células desde piel**

Las muestras de piel de 2x2 cm fueron depositadas en 1 mL de medio de digestión (RPMI + Colagenasa IV 2,5 mg/mL (Gibco) + DNAasa 6.25 µg/mL), posteriormente fue cortada en pequeños fragmentos de 2x2

mm aproximadamente e incubadas por 90 minutos a 37°C. Luego la suspensión celular se disgregó con un émbolo de jeringa sobre un cell strainer de 40 µm utilizando RPMI + 10% FCS hasta completar cinco mL, sobre hielo. La suspensión celular se contó utilizando cámara de Neubauer y azul de Tripán.

### **3.23 Citometría de flujo de superficie**

Las células se centrifugaron a 600 g por 7 min, se colocaron entre  $0,3 \times 10^6$  células en tubos eppendorf y se llevaron a un mL con PBS +2% FCS frío. Se centrifugaron a 600 g por cinco minutos, se resuspendió en 100 µL de PBS +2% FCS y se incubó en oscuridad por 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos diluidos en PBS + 2%FCS: IAd (39-10-8; APC), CD3 (APC), CD4 (PE/Cy7), CD86(GL-1; PE/GL-1; FITC), CD11c (N418; PE/Cy7) y V. Dye, este último se utilizó para excluir las células muertas (Todos los anticuerpos fueron comprados en Biolegend). Luego se agregaron 900 µL de PBS + 2% FCS y se centrifugó a 600 g por cinco minutos. Se resuspendieron las células en 300 µL de PBS +2% FCS para ser analizadas por citometría de flujo utilizando un Citómetro de Flujo FACS Canto II o un Cell Sorter FACS Aria III. Las muestras se analizaron utilizando el software FlowJo V10.

### **3.24 Marcaje de citoquinas intracelulares por citometría de flujo**

Luego del marcaje de superficie, las células se centrifugaron a 600 g por siete minutos y se resuspendieron en 200 µL de una

solución fría de fijación y permeabilización (Citofix/Cytoperm). Las células se incubaron por 20 minutos en oscuridad y frío, posterior a esto se lavaron con 700  $\mu$ L de Permwash frío 1X (diluido en agua Sanderson), se centrifugó a 700 g por siete minutos, se resuspendió en 50 $\mu$ L de Permwash 1x y se incubó con los siguientes anticuerpos intracelulares diluidos en Permwash 1x: IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$  (MAb11; FITC), IFN- $\gamma$  (XMG1.2; FITC) por 30 minutos en oscuridad y frío (Todos los anticuerpos fueron comprados en Biolegend). Luego se agregaron 700  $\mu$ L de permwash 1x y se centrifugaron a 700 g por siete minutos. Se resuspendieron en 300  $\mu$ L de PBS + 2% FCS para ser analizadas utilizando Citómetro de Flujo FACS Canto II o un Cell Sorter FACS Aria III. Las muestras se analizaron utilizando el software FlowJo V10.

### **3.25 CBA**

La biopsia de piel fue incubada por 24 horas a 37°C al 5% CO<sub>2</sub> en 200  $\mu$ L RPMI+10%FCS, luego de lo cual el sobrenadante se centrifugó a 600 g por siete minutos, se colectó la parte superior del sobrenadante y se guardó a -80°C para su posterior análisis.

Las muestras se analizaron utilizando el kit Th1/Th2/Th17 de BD siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente fueron analizadas en un Citómetro de Flujo FACS Canto II de manera de determinar la concentración de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-

17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). Las muestras se analizaron utilizando el software FlowJo V10.

### **3.26 Análisis Estadístico**

La diferencia estadística entre grupos se realizó por medio de ANOVA de una vía seguida de Test de Tukey de comparaciones múltiples. Por otro lado, la diferencia estadística entre dos grupos experimentales fue realizada por medio de la prueba Mann-Whitney. Los gráficos y análisis estadísticos fueron efectuados con el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias entre grupos fueron consideradas como no significativas cuando  $P$  o  $\alpha \geq 0,05$ , significativas cuando  $P$  o  $\alpha < 0,05$  (\*), muy significativa cuando  $P$  o  $\alpha < 0,005$ (\*\*) y extremadamente significativas cuando  $P$  o  $\alpha < 0,0005$  (\*\*\*) y  $P$  o  $\alpha < 0,0001$  (\*\*\*\*).



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efecto de la testosterona en la diferenciación de DCs derivadas de médula ósea.

Debido a que las DCs se encuentran normalmente en bajas proporciones en los tejidos, para su estudio se ha establecido el modelo de obtención de BMDC mediante el cultivo en presencia de GM-CSF (Helft, H. y col., 2015). Producto de su gran reproducibilidad se utilizaron en esta investigación para evaluar el potencial rol inmunomodulador de la testosterona en la iniciación de la psoriasis. En primera instancia, se evaluó el papel de la testosterona en la diferenciación de las DCs. Para esto, los precursores de DC derivadas de médula ósea se cultivaron en presencia de GM-CSF (que promueve su diferenciación) con o sin testosterona (ver tabla I). Los resultados obtenidos, graficados en la Figura 3 muestran que alrededor de un 40% de las células cultivadas se diferencian a DCs (Figura 3B) y que la administración de testosterona durante la diferenciación no provoca cambios en el porcentaje de células que se diferencian (expresión marcador CD11c) (Helft, H. y col., 2015) cuando es comparado con el grupo que no se incubó con testosterona (ST).

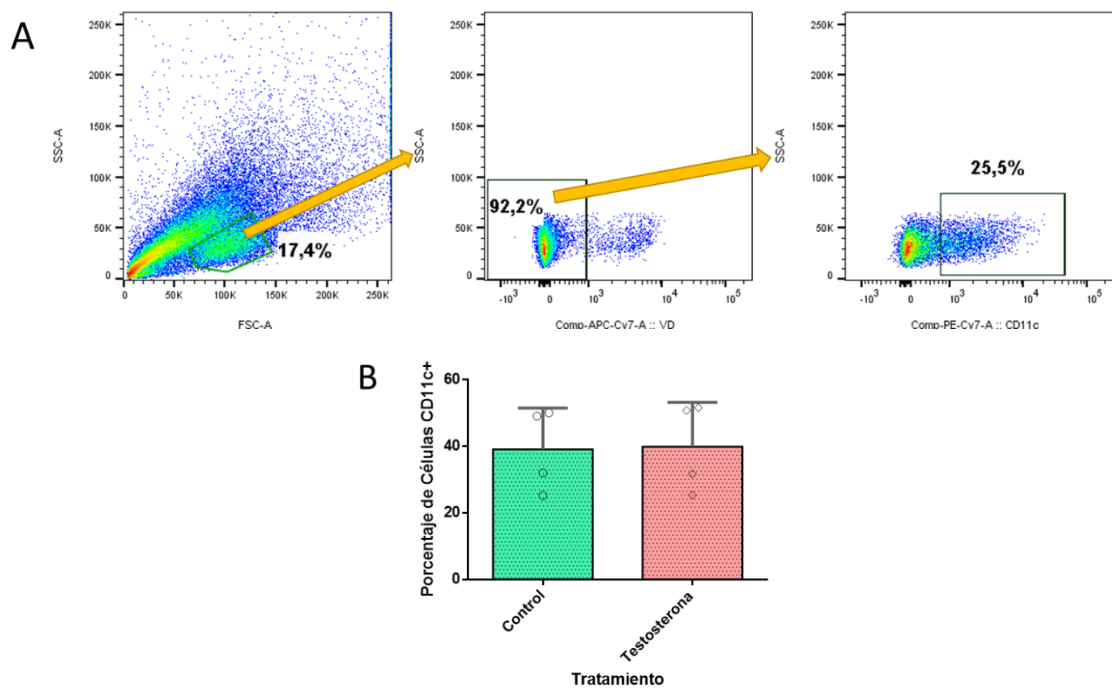
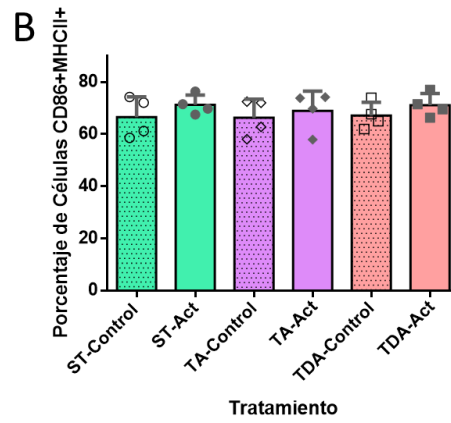
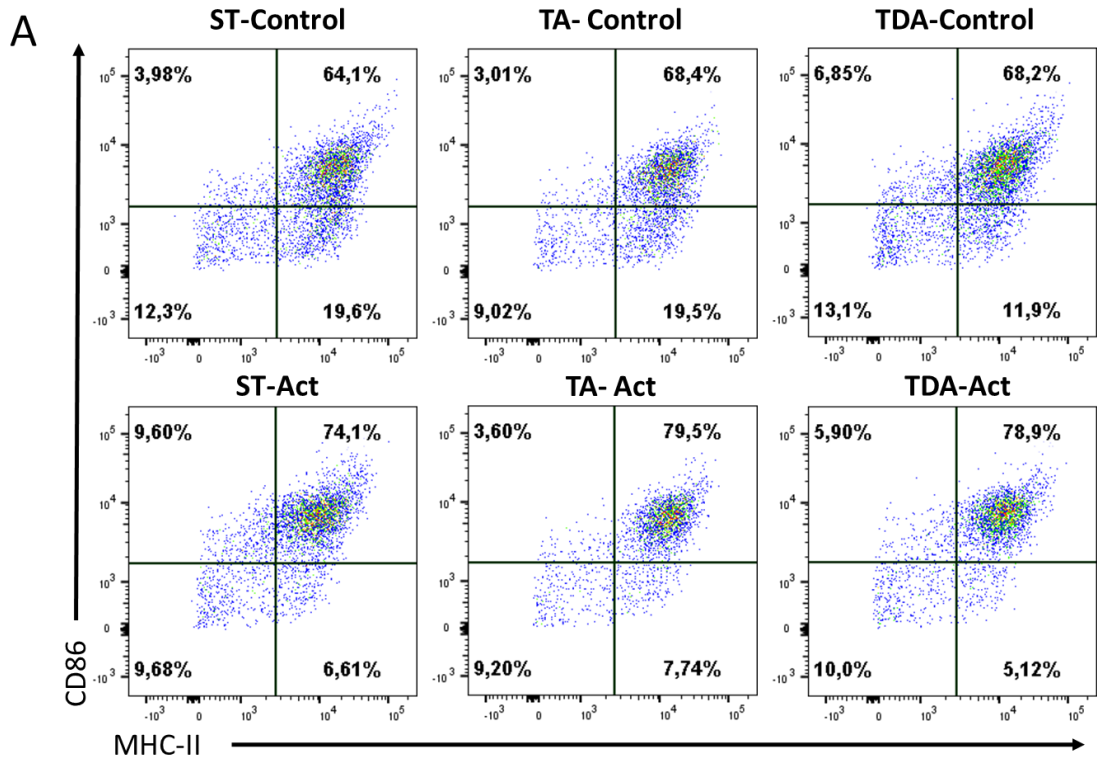


Figura 3. **La administración de testosterona (10  $\mu$ M) no produce cambios en la diferenciación de precursores de DC en cultivo.** Diferenciación de DCs a partir de precursores de médula ósea en presencia de testosterona o su vehículo (etanol absoluto). Al cabo de 6 días se midió mediante citometría de flujo el porcentaje de células que expresan el marcador CD11c en su superficie. A) Estrategia de gating representativa. B) Gráfico de barras muestra el porcentaje de células CD11c+ luego de cada tratamiento. n=4. Mann-Whitney  $P > 0,05$ .

#### 4.2 Efecto de la testosterona en la activación de DCs derivadas de médula ósea.

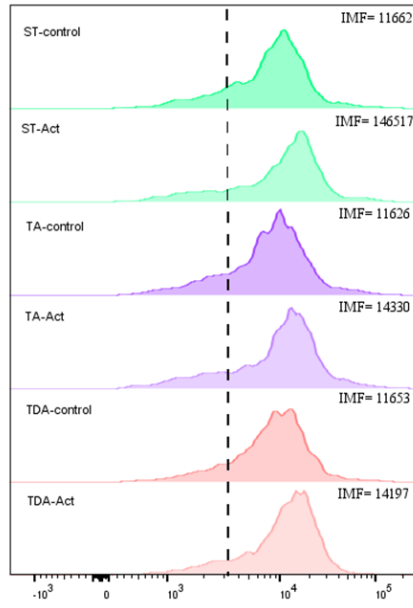
Lo siguiente fue evaluar el papel de la testosterona durante el proceso de activación de las DCs. Para esto, luego de la diferenciación las DCs se activaron con una molécula sintética agonista de TLR7/8 (R848). A través del análisis de la expresión de CD86 y MHC-II, podemos confirmar que al incubar las DCs con R848, éstas se activaron, puesto que aumentó el porcentaje de

células que expresa estos marcadores (Figura 4A). Adicional a lo anterior, los resultados indican que la testosterona no afecta el porcentaje de células que expresan estos marcadores. Al estudiar el nivel de expresión de CD86 y MHC-II, evaluado a través de la intensidad media de fluorescencia (IMF) se observa una tendencia al aumento cuando las células se incubaron con R848. Sin embargo, no se observaron cambios en el nivel de expresión de CD86 y MHC-II cuando las DCs fueron activadas en presencia de testosterona en comparación con células incubadas con el control del vehículo (Figura 4B-G). Por otro lado, mediante CBA se midió la cantidad de citoquinas secretadas por las DCs. Lo que se observó es que la activación de las DCs con R848 provoca en estas la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$ , secreción que no se ve afectada por la administración de testosterona (Figura 4H). Por lo tanto, los resultados obtenidos de este experimento *in vitro* sugieren que la administración de testosterona en el cultivo de BMDCs no afecta su diferenciación, activación o secreción de citoquinas.

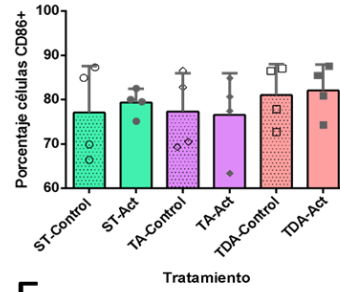


# CD86

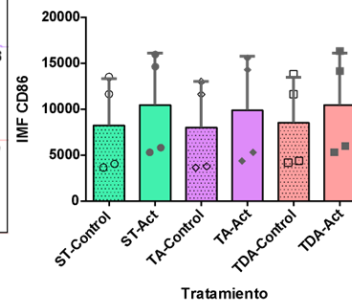
C



D

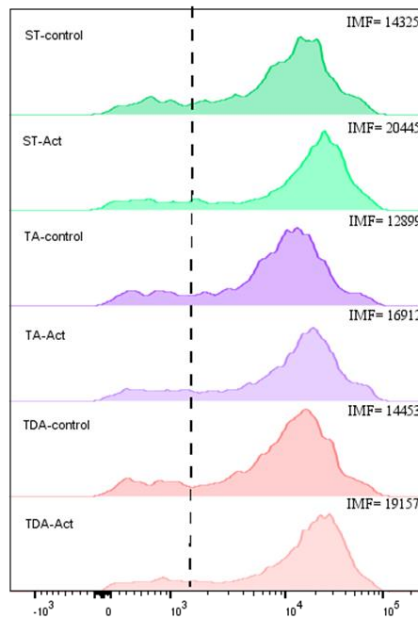


E

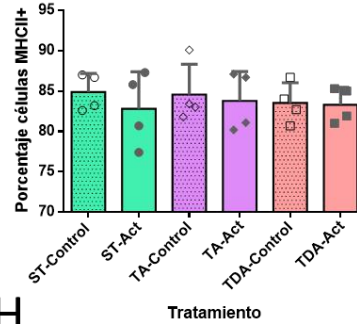


# MHCII

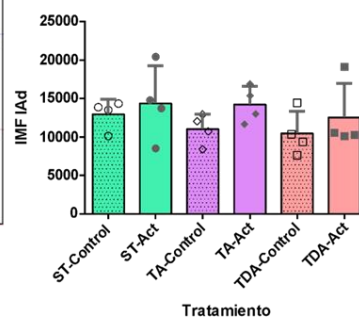
F



G



H



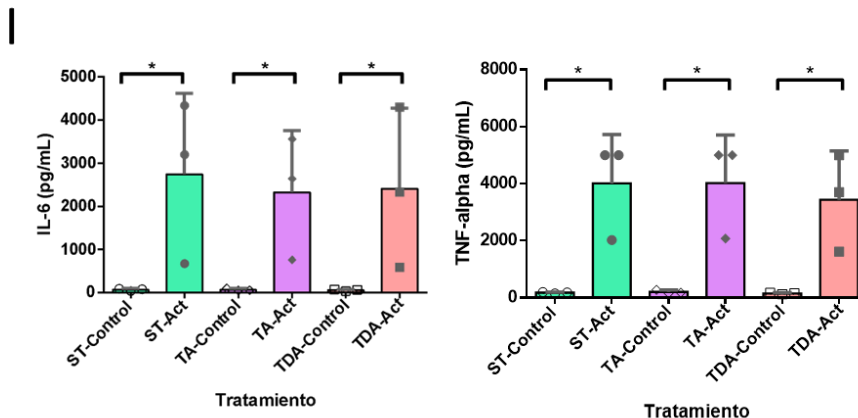


Figura 4. **La administración de Testosterona *in vitro* no modifica la expresión de marcadores de activación ni la producción de citoquinas por parte de las DCs.** Las DCs fueron incubadas con R848 (0,3 µg/mL) o solo con medio RPMI + 10%FCS por 4 horas. Luego de la incubación, se colectó el medio para medir la concentración de las citoquinas secretadas por CBA, posterior a esto las células se sacaron de la placa y se marcaron con anticuerpos conjugados para evaluar la expresión de CD86 y MHC-II por citometría de flujo. A. Dot Plot representativo de cada tratamiento, el panel superior derecho de cada gráfico da cuenta de la población CD86+MHCII+. B. El gráfico de barras muestra el porcentaje de células doble positivas (IAd+MHCII+) ( $p > 0,05$ ). C y F. Histogramas representativos del porcentaje de células positivas para CD86 y MHC-II, respectivamente. D y G. Gráfico de barra muestra el porcentaje de células CD86+ y MHCII+, respectivamente ( $p > 0,05$ ). E y H. Gráfico de barra muestra intensidad media de fluorescencia de CD86 y MHCII en las DCs, respectivamente ( $p > 0,05$ ). I. El gráfico de la izquierda muestra la concentración de IL-6 secretada por las DCs en pg/mL ( $p < 0,05$ ). El gráfico de la derecha muestra la concentración de TNF- $\alpha$  secretado por las DCs en pg/mL ( $p < 0,05$ ). A-G. n=4. H. n=3 Test Tukey  $\alpha < 0,05$  (\*).

#### 4.3 Efecto de la testosterona en la producción de TNF- $\alpha$ e IL-12 por parte de las DCs derivadas de médula ósea.

Se advierte de los resultados, que la testosterona no ejerce un efecto en la secreción de TNF- $\alpha$  por parte de la DC, pero ¿Qué sucede con la cantidad de células que producen esta citoquina? Para contestar esta pregunta, las DCs diferenciadas a partir de

precursores de médula ósea se activaron por 4 horas con R848 en presencia de un inhibidor de la secreción de vesículas como es Brefeldina A para medir citoquinas intracelulares por citometría de flujo. Al evaluar la producción de TNF- $\alpha$  por parte de las DCs fue posible observar que la presencia de testosterona durante la diferenciación y activación, o solo en la activación, no produce efecto ni en la cantidad de células que producen TNF- $\alpha$  ni en la cantidad de esta citoquina producida por las DCs (Figura 5B y C). Por otro lado, se evaluó otra citoquina que es producida por las DCs, que promueve la diferenciación de los linfocitos T y que está vinculada a la angiogénesis, la IL-12. La cantidad de DCs que producen esta citoquina no cambia cuando se administra testosterona (TA y TDA) al comparar con el control del vehículo (ST) (Figura 5E). Interesantemente, la intensidad media de fluorescencia para IL-12, lo cual da cuenta de la cantidad de IL-12 producida por estas células, aumenta en el grupo en que se incubaba con testosterona durante la diferenciación y activación (TDA) cuando se compara con los otros tres grupos (control, ST y TA). Estos resultados sugieren que la testosterona no produce cambios en la cantidad de DC productoras de TNF- $\alpha$  o IL-12, como tampoco en la cantidad de TNF- $\alpha$  producido por estas células, pero sugieren que aumenta la cantidad de IL-12 producida por estas DCs.

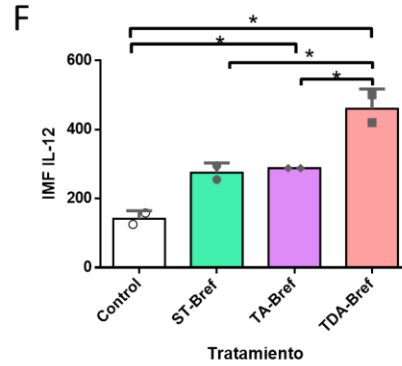
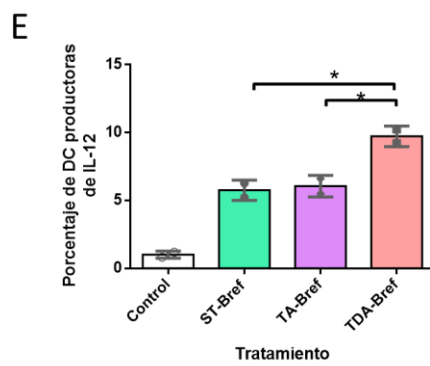
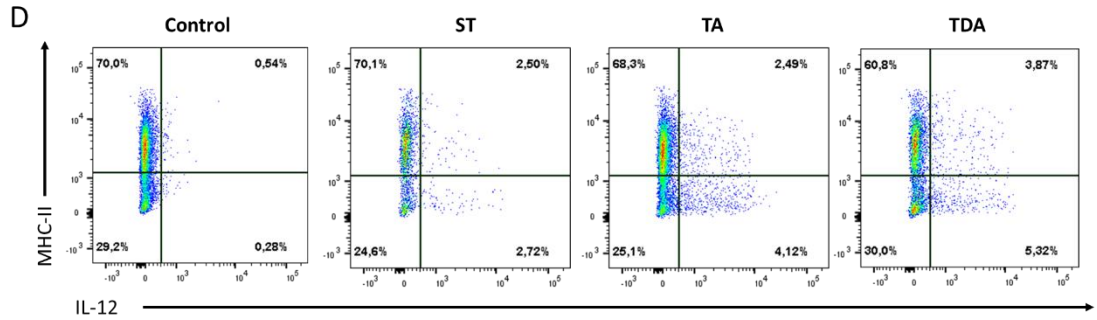
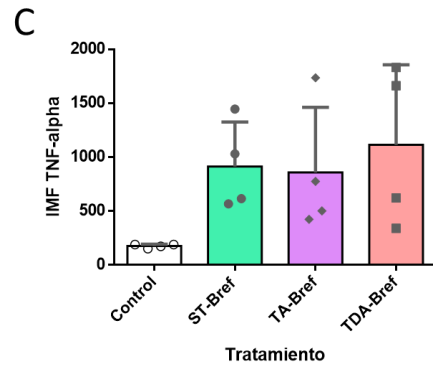
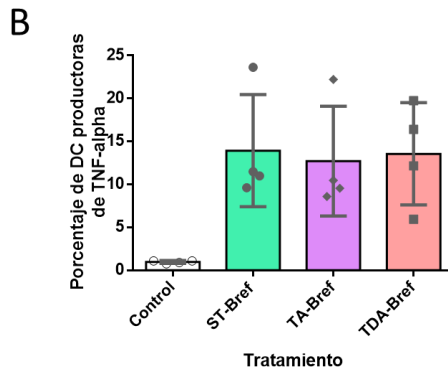
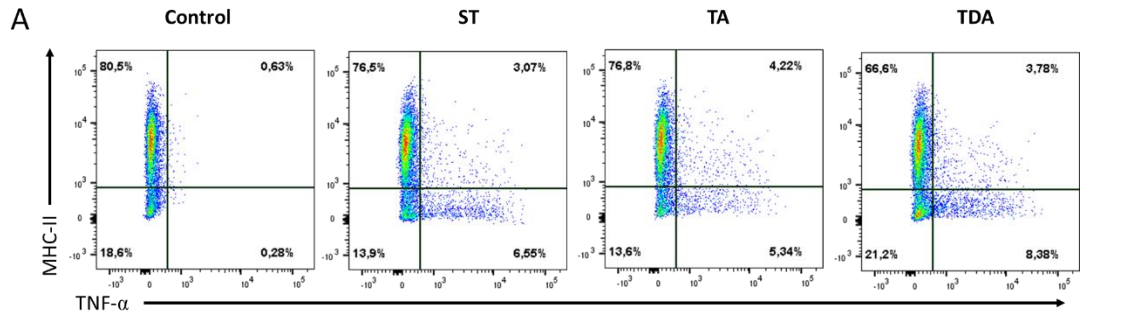




Figura 5. **La administración de Testosterona *in vitro* no modifica la cantidad de DCs productoras de TNF- $\alpha$  o IL-12.** Las DCs fueron incubadas con R848 (0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + brefeldina (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 4 horas. Luego de la incubación las células se colectaron, permeabilizaron y marcaron con anticuerpos para evaluar la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-12 por citometría de flujo. El control corresponde a DCs incubadas con las mismas condiciones descritas anteriormente, pero en ausencia de anticuerpo para TNF- $\alpha$  o IL-12, respectivamente. A. Dot plot representativo de la cantidad de células que producen TNF- $\alpha$  para cada tratamiento. B. Gráfico de barra muestra la cantidad de DCs productoras de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). C. Gráfico de barra muestra la intensidad media de fluorescencia de TNF- $\alpha$  de las DCs ( $p > 0,05$ ). D. Dot plot representativo de la cantidad de células que producen IL-12 para cada tratamiento. E. Gráfico de barra muestra la cantidad de DCs productoras de IL-12 ( $p < 0,05$ ). F. Gráfico de barras muestra intensidad media de fluorescencia de IL-12 de las DCs ( $p < 0,05$ ). A-C.  $n=4$ , D-G.  $n=2$ . Test Tukey  $\alpha < 0,05$  ( $P^*$ ).

#### **4.4 Evaluación del potencial rol inmunomodulador de la testosterona en las lesiones de dermatitis psoriasiforme.**

Basándose en los diversos estudios que han demostrado un potencial rol de la testosterona en la psoriasis (Kalinchenko, S.Y. y col., 2010; Saad, F. y col., 2016; Eltaweel, A. y col., 2018), se procedió a evaluar diversos parámetros en la piel en un modelo murino. Para determinar si la testosterona ejercía un rol en modular la dermatitis psoriasiforme, se utilizó un modelo agudo de inducción con IMQ (6 días de tratamiento) y se evaluaron 2 condiciones para lograr un aumento de testosterona en los ratones: 1) inyección intramuscular de testosterona en dosis única y 2) cópula, condición en la cual los ratones fueron expuestos al contacto con hembras durante una semana, previo a la inducción de dermatitis psoriasiforme. Durante la inducción del modelo de

psoriasis, fueron registrados el índice de severidad de área corporal (PASI) y el porcentaje de pérdida de peso.

Lo primero que se observa en el dorso del animal depilado con inducción de dermatitis psoriasiforme (de aquí en adelante ratón o individuo psoriásico) es un aumento del eritema seguido por aparición de escamas, coexistiendo ambos el día de la eutanasia (Figura 6A-B y D). La suma de estos parámetros conforma el PASI total, el cual tiene una puntuación de 0-8, en donde 0 corresponde a la ausencia de eritema y escamas y 8 a la máxima manifestación de ambos en la piel. En el caso de los individuos control, estos parámetros se mantienen en 0, mientras que en los individuos psoriásicos aumenta su severidad a medida que se mantiene la aplicación tópica de IMQ (Figura 6D).

Como se mencionó antes el PASI además permite evaluar la efectividad de un determinado tratamiento. Nuestros resultados indican que al aumentar los niveles de testosterona (tanto por administración externa como por los efectos de la cópula) no se produce una disminución del eritema o escamas que sea estadísticamente significativa (Figura 6D). Esto se traduce en que el PASI total no disminuye con respecto al individuo control (Figura 6B). Un parámetro adicional que se midió fue el grosor de piel de los individuos. Lo que se observa es que en general el grosor de piel es mayor en los individuos psoriásicos que en los

controles, pero esa diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 6C).

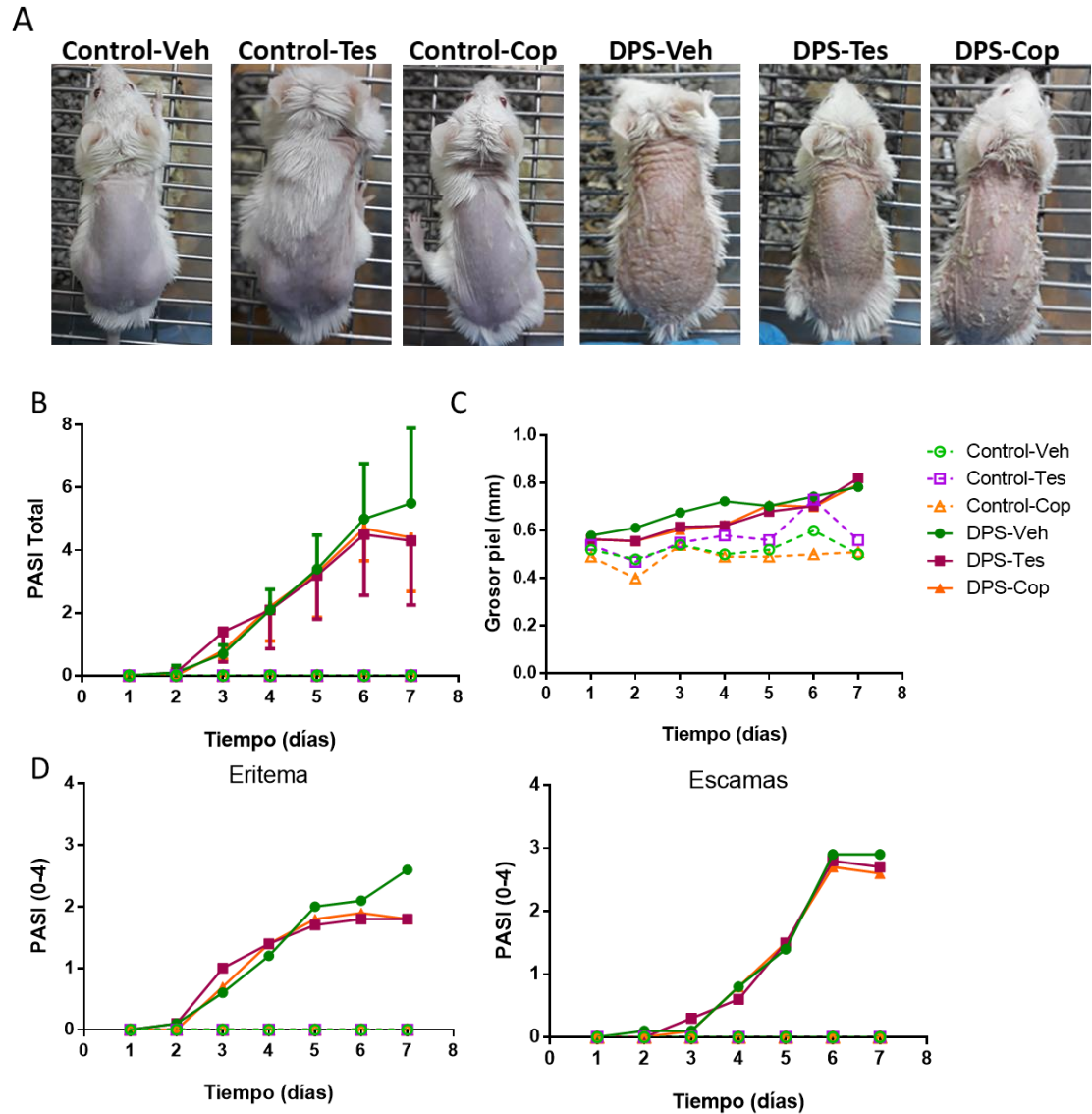


Figura 6. La evolución de las características psoriásicas medidas como PASI y grosor de piel no es diferente entre los individuos psoriásicos tratados con testosterona y el control. Se administró testosterona (1 mg/50  $\mu$ L) o su vehículo en dosis única intramuscular 2 días antes de la aplicación de IMQ. Se aplicó IMQ o su vehículo durante 6 días en el dorso depilado de los ratones. Durante este periodo se tomó registro del eritema, escamas y grosor de piel, incluyendo el día de la eutanasia en la caracterización. A. Se muestran fotografías representativas correspondientes a los cambios morfológicos en la piel de la zona dorsal de los ratones al día 7 (día de eutanasia) para cada una de las

condiciones. B. Gráfico muestra PASI total de los 6 días (días 1-6) de tratamiento y el día de eutanasia (día 7) para cada una de las condiciones ( $P>0,05$ ). C. Gráfico muestra el grosor de piel de los 6 días (días 1-6) de tratamiento y el día de eutanasia (día 7) para cada una de las condiciones ( $P>0,05$ ). D. Gráficos muestran los parámetros independientes que componen el PASI total; a la izquierda se muestra la cantidad de eritema y a la derecha se muestra la cantidad de escamas, ambos con una escala de 1-4 ( $P>0,05$ ). Ratones DPS de las 3 condiciones  $n=5$ ; Control-Veh  $n=1$ ; Control- Tes y Cop  $n=2$ . Mann-Whitney  $P>0,05$ .

#### **4.5 Evaluación del potencial rol inmunomodulador de la testosterona en las características morfológicas de la piel en la psoriasis.**

La piel psoriásica presenta una morfología distintiva que es posible observar mediante tinción H&E (Wagner, E.F. y col., 2010). Esta tinción permite ver los fenómenos de acantosis, paraqueratosis, hiperqueratosis e infiltración celular en un corte histológico (Figura 7A). Se puede observar que existe esta morfología distintiva en los individuos psoriásicos y que es inexistente en los individuos control (Figura 7A). Existe un aumento del grosor de la epidermis en los individuos psoriásicos, lo que se conoce en histología como acantosis (Figura 7B). La testosterona no tiene efecto ni en el grosor de la epidermis ni en el infiltrado celular entre los individuos tratados con testosterona y el control (Figura 7B y C).

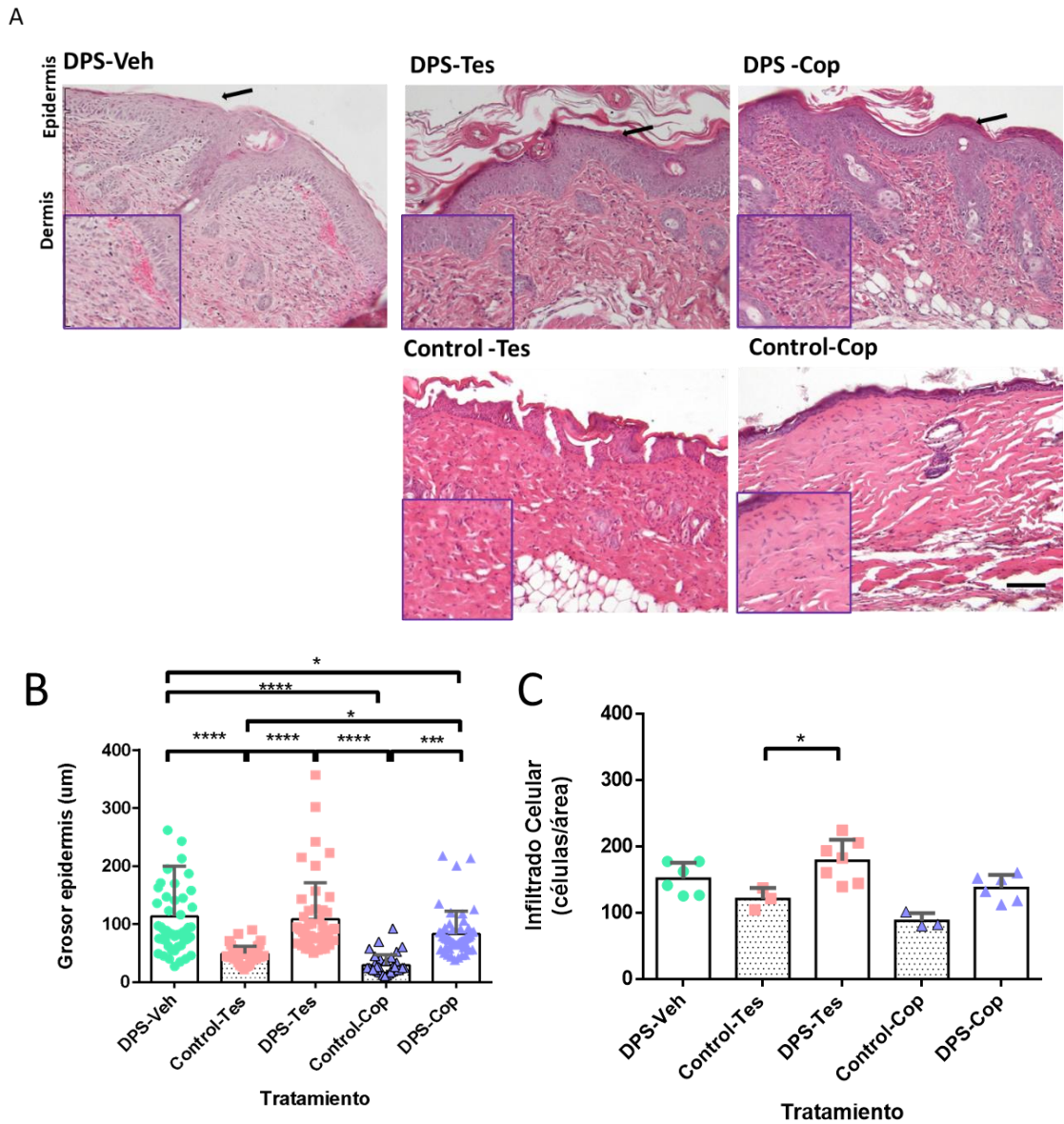


Figura 7. Las características morfológicas de la piel con psoriasis no son modificadas producto del aumento de la testosterona. Se administró testosterona (1 mg/50  $\mu$ L) o su vehículo en dosis única intramuscular 2 días antes de la aplicación de IMQ. Las muestras de piel fueron colectadas al día siguiente de los 6 días de aplicación de IMQ o su vehículo (día 7, eutanasia). A. Imágenes representativas de cortes histológicos de piel sometidos a tinción H&E para cada una de las condiciones. En los cortes de individuos psoriásicos es posible observar paraqueratosis, hiperqueratosis (Flecha negra), acantosis e infiltrado celular (recuadro parte inferior izquierda). B. Cuantificación del Grosores de piel ( $p < 0,05$ ). C. Cuantificación del infiltrado celular ( $p < 0,05$ ). Barra de tamaño corresponde a 100  $\mu$ m. Test Tukey  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,005$  (\*\*),  $\alpha < 0,0005$  (\*\*\*) y  $\alpha < 0,0001$  (\*\*\*\*).

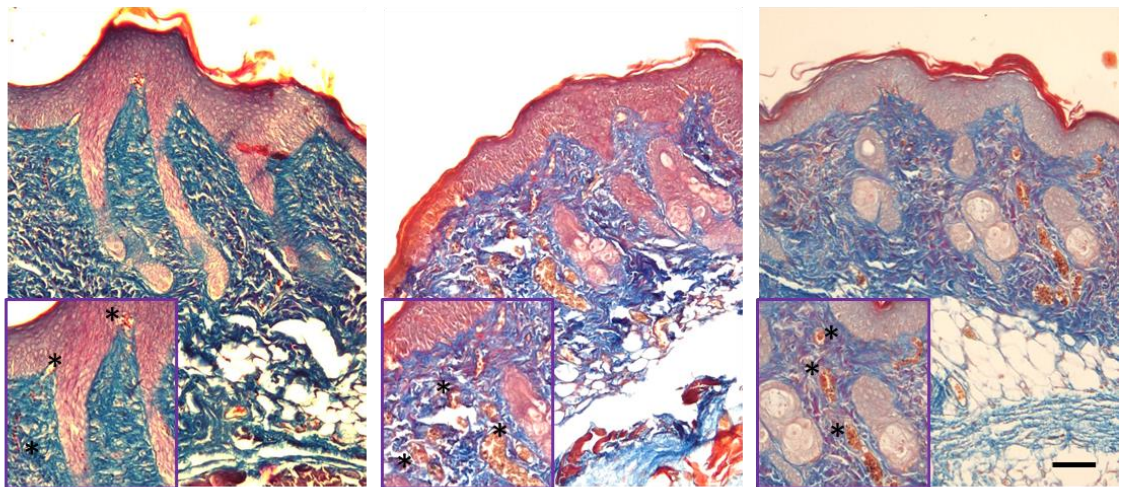
Otra característica morfológica importante es el aumento de vasos sanguíneos en la piel psoriásica. Para evaluar este parámetro las muestras de piel del dorso del animal fueron tratadas para realizar tinción tricrómica de Mallory. Para evaluar si la testosterona disminuye esta característica se observaron cortes histológicos con tinción tricrómica de Mallory en los individuos psoriásicos (Figura 8A). Lo que se observó es que hay un área cubierta por vasos sanguíneos que no es diferente entre los grupos que tienen un aumento en la testosterona y el control (Figura 8B).

A

DPS-Veh

DPS-Tes

DPS-Cop



**B**

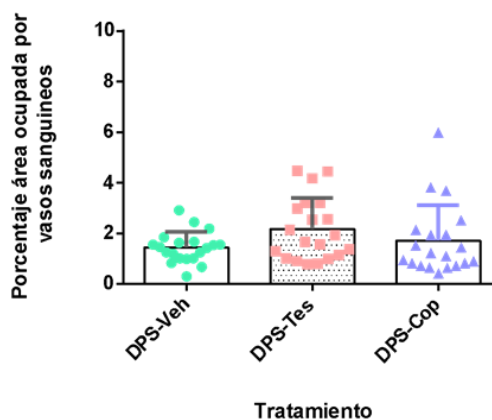


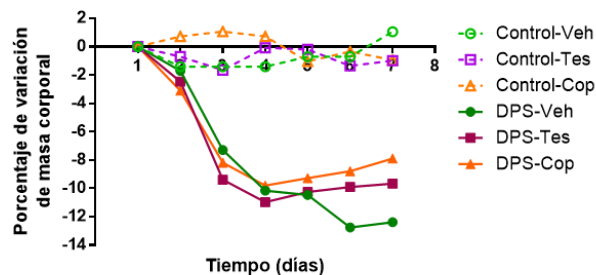
Figura 8. **El aumento de la vascularización en individuos psoriásicos no se ve afectada producto de un aumento de la testosterona.** Se administró testosterona (1 mg/50  $\mu$ L) o su vehículo en dosis única intramuscular 2 días antes de la aplicación de IMQ. Las muestras de piel fueron colectadas al día siguiente de los 6 días de aplicación de IMQ o su vehículo (día 7, eutanasia). A. Imágenes representativas de cortes histológicos de piel de ratones psoriásicos sometidos a tinción tricrómica de Mallory para cada una de las condiciones. Panel izquierdo corresponde a DPS-Veh, panel central corresponde a DPS-Tes y el panel derecho corresponde a DPS-Cop. Cuadrado en el sector inferior izquierdo de cada imagen muestra un aumento de la zona donde es posible observar los vasos presentes en la dermis. B. Cuantificación del área ocupada por vasos sanguíneos ( $p > 0,05$ ).  $n = 5$ .

#### 4.6 Efecto de la testosterona en la masa corporal y en bazo.

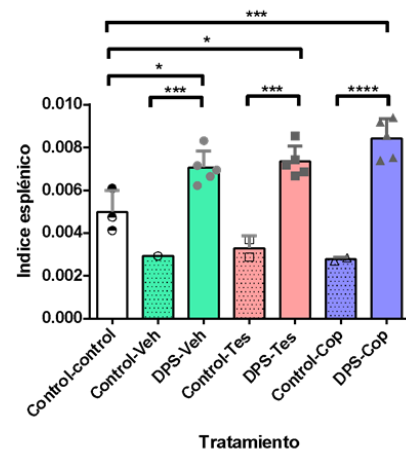
La inducción de dermatitis psoriasiforme lleva consigo una pérdida de peso por parte del ratón (Horváth, S. y col., 2020). En esta investigación fue posible observar que si bien en los últimos dos días de inducción con IMQ, hay una tendencia a mantener el peso en los grupos en los que aumenta la testosterona (DPS-Tes y DPS-Cop) la diferencia que se ve con respecto al control no es estadísticamente significativa (Figura 9A).

El bazo es un órgano linfoide secundario en donde ocurre la presentación antigénica por parte de las DC. Se ha considerado en otros estudios por su aumento en el largo y peso en los individuos psoriásicos con respecto a los controles (Van der Fist, L. y col., 2009; Jabeen, M. y col., 2020). Dados los antecedentes expuestos se consideró un órgano importante de evaluar. Se encontró un aumento del índice esplénico y la celularidad del bazo en todos los grupos psoriásicos, no así en los controles. Sin embargo, la testosterona no provoca cambios en estos aspectos (Figura 9B y C). Por otro lado, se evaluó el tamaño del bazo, revelando una diferencia significativa entre el grupo control-Cop y DPS-Cop, siendo este último el que tiene mayor largo (Figura 9D), sin observarse diferencias estadísticamente significativas en los otros grupos de estudio. Los resultados sugieren que la testosterona protege de la pérdida de peso hacia el final del tratamiento.

A



B





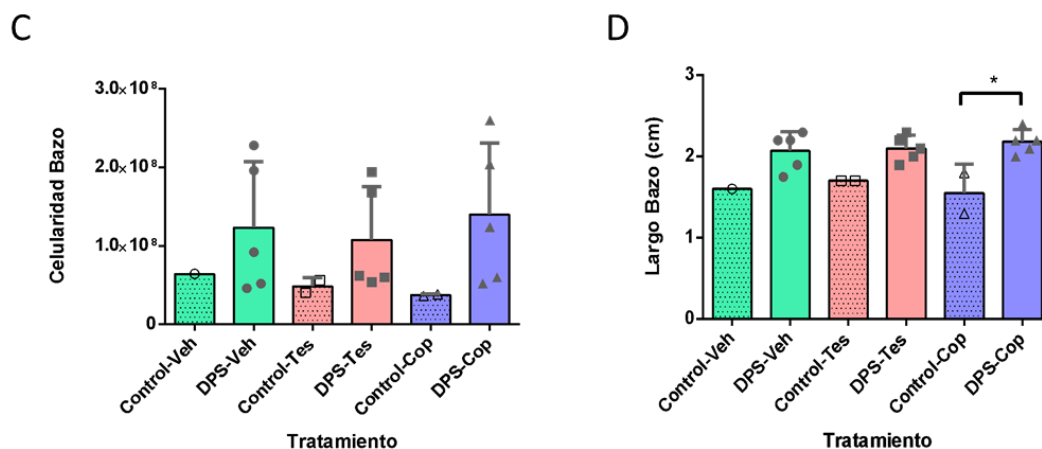


Figura 9. **La testosterona no tiene efecto en la masa corporal de los individuos ni en el largo o celularidad del bazo.** La masa corporal se registró a diario antes de la inducción de DPS por los 6 días de tratamiento y el día de eutanasia, al momento de esta. El largo y peso del bazo se registraron inmediatamente después de la eutanasia. El cálculo de la celularidad del bazo se realizó homogeneizando el tejido del bazo y luego contando en cámara de Neubauer. A. Porcentaje de variación de masa corporal durante el periodo de inducción de DPS (Mann-Whitney  $P > 0,05$ ). B. Índice esplénico (masa bazo/masa corporal) de cada condición ( $P < 0,05$ ). C. Cantidad de células totales de bazo ( $P > 0,05$ ). D. Largo Bazo de cada condición ( $P < 0,05$ ). Ratones DPS de las 3 condiciones  $n=5$ ; Control-Veh  $n=1$ ; Control Tes y cop  $n=2$ . Test Tukey  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,005$  (\*\*),  $\alpha < 0,0005$  (\*\*\*) y  $\alpha < 0,0001$  (\*\*\*\*).

#### 4.7 Fenotipificación de las poblaciones Th1 y Th17 en bazo.

Debido a que el tamaño del bazo aumenta en los individuos psoriásicos y que en la investigación de Van der Fits y colaboradores se observaron y describieron los cambios en las poblaciones celulares presentes en este, es que en este estudio se consideró que la testosterona podría ejercer algún rol a nivel celular (Van der Fits, L y col., 2009). En cuanto a las poblaciones celulares del bazo se encontró que hay una disminución de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los individuos psoriásicos con respecto a

animales controles, esto último en línea con lo reportado en la literatura (Figura 10A-C) (Van der Fits, L y col., 2009).

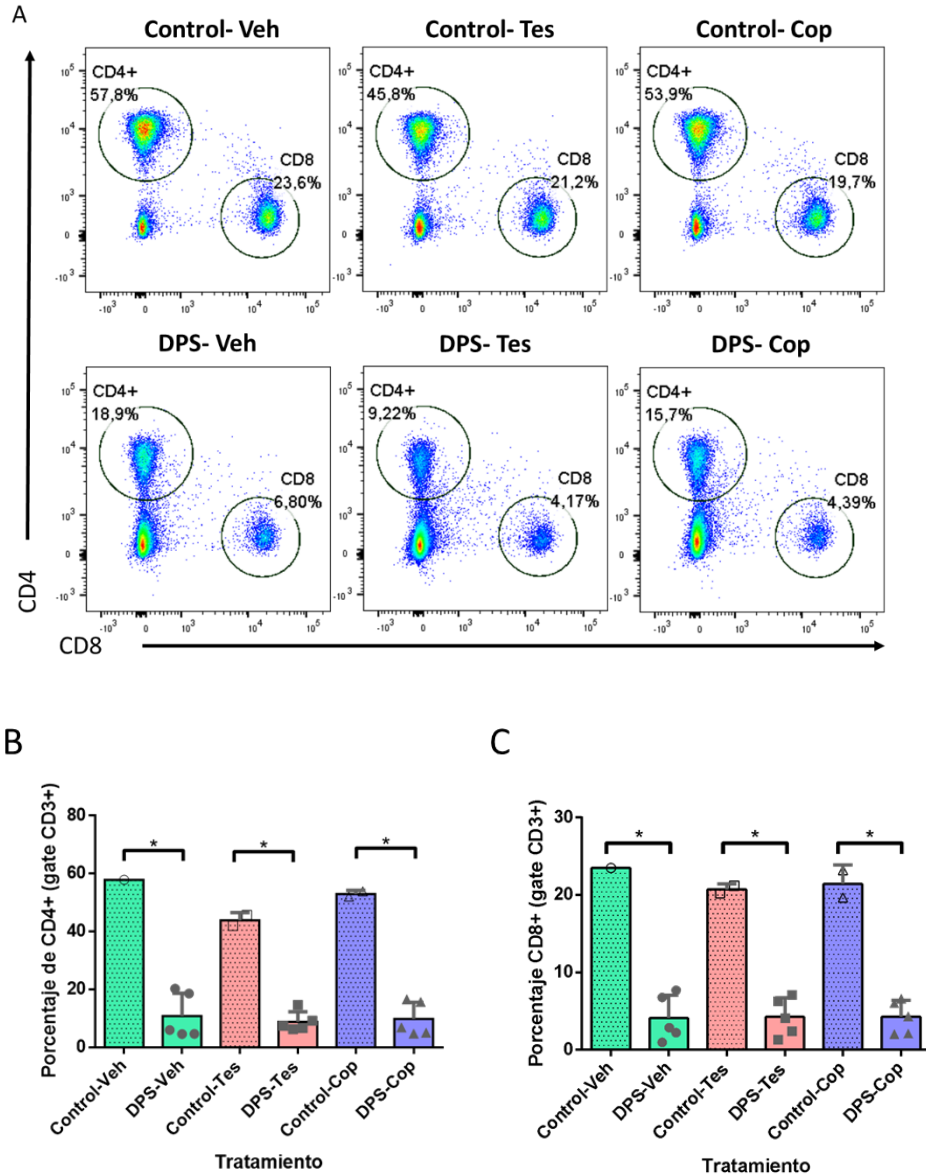
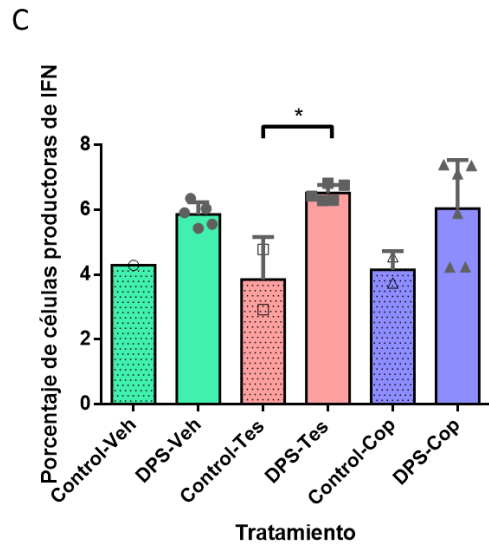
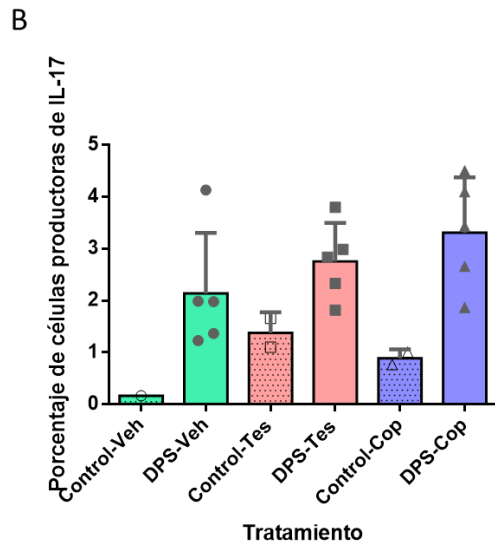
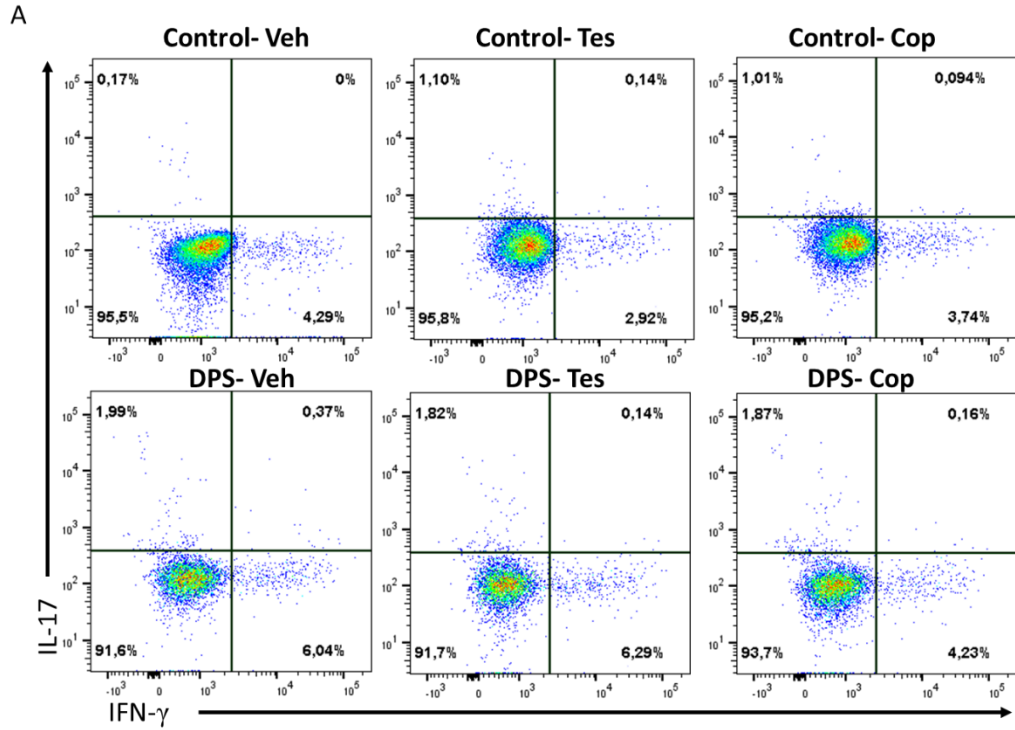


Figura 10. **La testosterona no tiene efecto en el porcentaje de células CD4+ o CD8+.** El bazo fue perfundido e incubado por 4 horas con PMA (1 mM), Ionomicina (0,5 mg/mL) y brefeldina (5 mg/mL). Luego de la incubación se colectaron las células y se marcaron con anticuerpos conjugados para evaluar la expresión de CD4 y CD8 por citometría de flujo. A. Dot plot representativo de poblaciones CD4+ y CD8+ para cada condición. B y C. Gráfico de barra muestra la cantidad de células CD4+ y CD8+ totales para cada condición, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Test Tukey  $\alpha < 0,05$ .

Lo siguiente fue observar si había una disminución en la cantidad de células CD4+ o CD8+ productoras de IL-17 o IFN- $\gamma$ , puesto que estas poblaciones en particular tienen un papel importante en el desarrollo de la psoriasis. En acuerdo con datos de la literatura (Van der Fits, L. y col., 2009), en todos los individuos psoriásicos hay un aumento en la cantidad de células CD4+ productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$  (Figura 11A-C). Sin embargo, la cantidad de réplicas experimentales no nos permitió tener resultados estadísticamente significativos. Por otra parte, no hay diferencias entre los ratones tratados con testosterona y los controles (Figura 11B-C).

Como se muestra en la Figura 11E, la cantidad de células CD8+ productoras de IL-17 aumentan levemente en los ratones controles con respecto a los ratones psoriásicos que han tenido un aumento en los niveles de testosterona, pero la testosterona no provoca una diferencia en la cantidad que sea estadísticamente significativa. Con respecto a la cantidad de células CD8+ productoras de IFN- $\gamma$ , se observa una tendencia a la disminución en los grupos psoriásicos control y con inyección de testosterona con respecto a sus controles y una tendencia al aumento en el grupo de cópula con respecto a su control, pero ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa (Figura 11F). Los resultados sugieren que la testosterona no estaría ejerciendo

ningún efecto ni en la cantidad de células CD4+ y CD8+ ni en la producción de citoquinas por parte de estas.



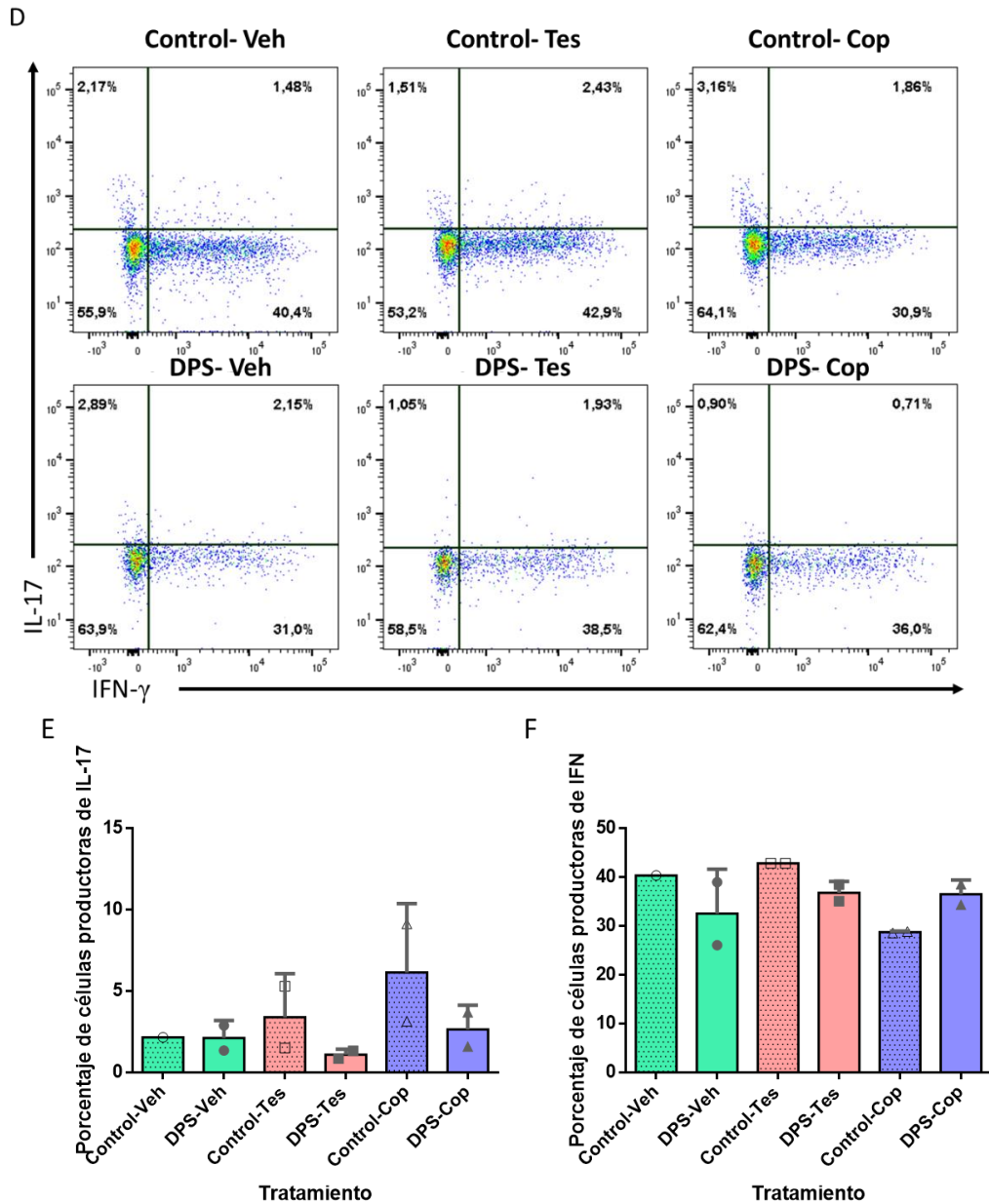


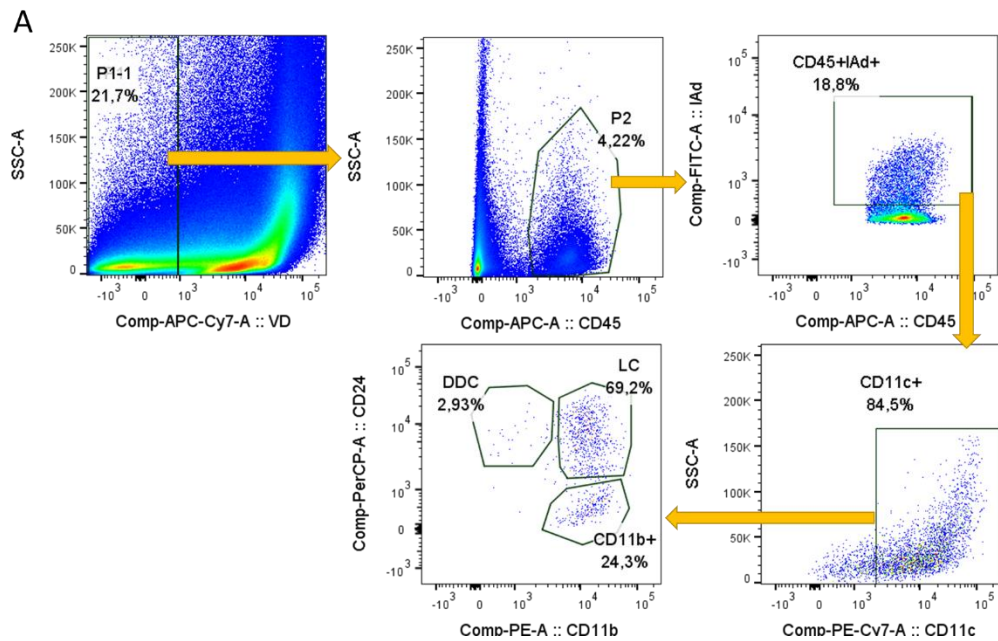
Figura 11. **La testosterona no tiene efecto en la producción de citoquinas IL-17 e IFN por parte de las células CD4+ y CD8+.** El bazo fue perfundido e incubado por 4 horas con PMA (1 mM), Ionomicina (0,5 mg/mL) y brefeldina (5 mg/mL). Luego de la incubación se colectaron las células y se marcaron con anticuerpos conjugados para evaluar la expresión de IL-17 e IFN- $\gamma$  por citometría de flujo. A. Dot plot representativo del porcentaje de células CD4+ productoras de las citoquinas IL-17 e IFN- $\gamma$ , para cada condición. B y C. Gráfico de barra muestra el porcentaje de células CD4+ productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ). D. Dot plot representativo del porcentaje de células CD8+ productoras de las citoquinas IL-17 e IFN- $\gamma$ , para cada condición. E y F. Gráfico de barra muestra el porcentaje de células CD8+ productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ , respectivamente ( $P > 0,05$ ). A-F Ratones DPS de las 3 condiciones n=5;

Control-Veh n=1; Control Tes y cop n=2. G-I. Control-Veh n=1, las otras condiciones n=2. Test Tukey  $\alpha < 0,05$ .

#### **4.8 Efecto de la testosterona en la población de células dendríticas de la piel.**

Se consideró en principio que la mejora en los pacientes con *psoriasis vulgaris* y que se realizan terapia de reemplazo de testosterona (Cemil, B.C. y col., 2015; Eltaweel, A. y col., 2018) era producto de una disminución de poblaciones TCD4 o TCD8 en el organismo. Como nuestros resultados no son equivalentes se consideró que el andrógeno podría tener su efecto a nivel de la piel. Lo primero que se hizo fue caracterizar los subtipos de DCs de la piel de ratón BALB/c. Para este propósito se analizó la piel de un ratón sano. Lo que se encontró fueron tres subtipos: células dendríticas dermales (CD24+CD11b-), células de Langerhans (CD24+CD11b+) y células dendríticas CD11b+ (Figura 12A). Conociendo los subtipos de DCs presentes en la piel se procedió a observar cómo cambiaba el perfil con respecto al individuo sano. De manera interesante, en individuos con psoriasis no se pudo analizar las poblaciones de DCs en piel, puesto que la población de células presentadoras de antígeno se reduce notablemente (CD45+IAd+) (Figura 12B-D). Sin embargo, no se observaron cambios en las poblaciones de DCs en los ratones que tenían aumentada la testosterona al comparar con el control de vehículo (Figura 12B-D).

A continuación, se midió la producción de citoquinas en piel mediante CBA por parte de las poblaciones presentes en la piel. Lo que se observó es una tendencia a la disminución de la secreción de la citoquina IL-6 en los individuos que tienen un aumento en la testosterona y que esta tendencia es acentuada cuando el individuo es psoriásico (Figura 12E). Los resultados sugieren que la testosterona no tiene un efecto en las poblaciones de DCs, algo que ya se había observado en el experimento *in vitro*, pero al parecer la testosterona podría estar provocando una disminución en los niveles de IL-6 en individuos control y psoriásicos, secretados por las células presentes en la piel de ratones control.



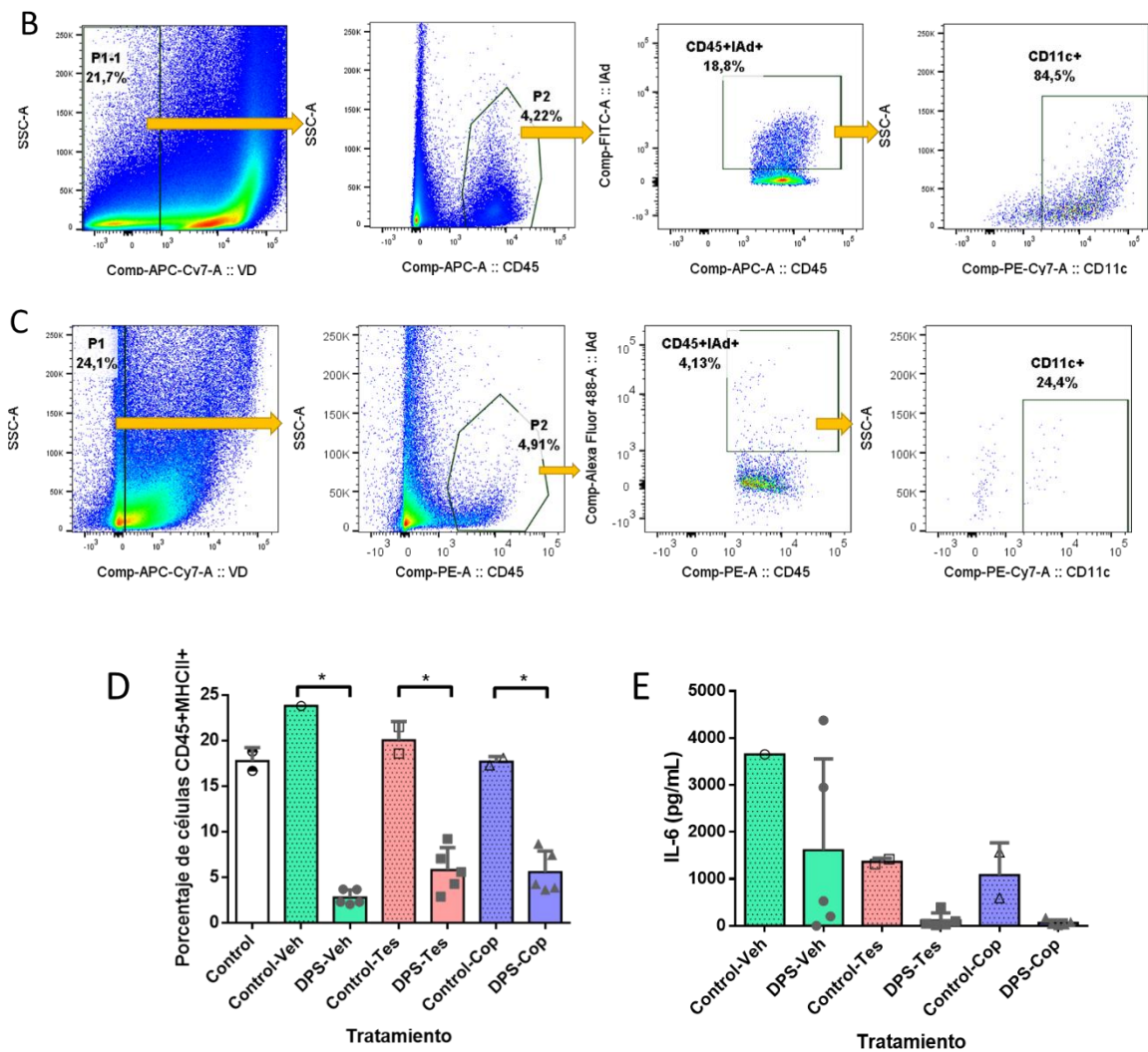


Figura 12. La testosterona no provoca cambios en el perfil de las poblaciones de DC, pero estaría produciendo un cambio en la secreción de citoquinas presentes en la piel. La muestra de piel para el análisis de subtipos de DCs se homogeneizó y se incubó con Colagenasa IV 2,5 mg/mL (Gibco) y DNAasa 6.25  $\mu$ g/mL, luego de lo cual se colectaron las células y se marcaron con anticuerpos conjugados para evaluar la expresión de CD45, CD11c y MHC-II (IAd). La muestra de piel para CBA, se colectó mediante un punch de biopsia, el cual se dejó incubando por 24 horas. Luego de la incubación se colectó el sobrenadante que se marcó mediante CBA para conocer la concentración de citoquinas secretadas. A. Secuencia de análisis de DC de piel, el último dot plot del panel inferior izquierdo muestra las poblaciones de DCs que se encuentran en la piel de un ratón sano. B y C. Secuencia de análisis de DCs de piel para individuos control y psoriáticos, respectivamente. D. Cuantificación células doble positivas (CD45+ MHCII+) ( $P < 0,05$ ). E. Cuantificación CBA para IL-6 ( $P < 0,05$ ). Test Tukey  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,005$  (\*\*),  $\alpha < 0,0005$  (\*\*\*) y  $\alpha < 0,0001$  (\*\*\*\*).



#### **4.9 Efecto del estrés sobre la inducción de dermatitis psoriasiforme.**

Se ha reportado en la literatura que hay un efecto del estrés en gatillar la psoriasis como también en exacerbar la enfermedad (Rousset, L. y Halioua, B., 2018). En esta investigación no se tenía por objetivo evaluar este parámetro de forma directa, aunque sí fue considerado para poder analizar de forma correcta los resultados del efecto de la testosterona. La inducción de dermatitis psoriasiforme se realizó en dos instancias, las que se denominaron set experimental 1 y 2. Estos individuos tuvieron diferencias en cuanto a la cantidad de ruido exterior y cantidad de visitas al bioterio por semana, siendo ambas menores en el segundo set experimental.

Existen estudios en los que se ha mostrado la relación entre estrés y un aumento de la masa de la glándula suprarrenal (Ulrich-Lai, Y. y col., 2006; Ludescher, B. y col., 2008). Por tanto, este método fue utilizado para conocer si el ratón estaba o no estresado. Como se muestra en la Figura 13A el segundo set experimental en todos los grupos tiene un aumento en la masa de la glándula suprarrenal en comparación con el primer set experimental, que es significativamente diferente. Este efecto del estrés se ve reflejado en la severidad de la dermatitis psoriasiforme que presentan los individuos (Figura 13B). Los resultados indican que los individuos del segundo set experimental

presentan una dermatitis psoriasiforme más grave que los del primer set experimental. Lo anterior se puede observar en la Figura 13B, donde el PASI total de los individuos del segundo set es mayor a los del primer set experimental. También es posible observar esta diferencia en los parámetros que componen el PASI total. Estos resultados a pesar de no tener diferencias estadísticamente significativas sugieren que el estrés provoca un aumento en la gravedad de la A psoriasis.

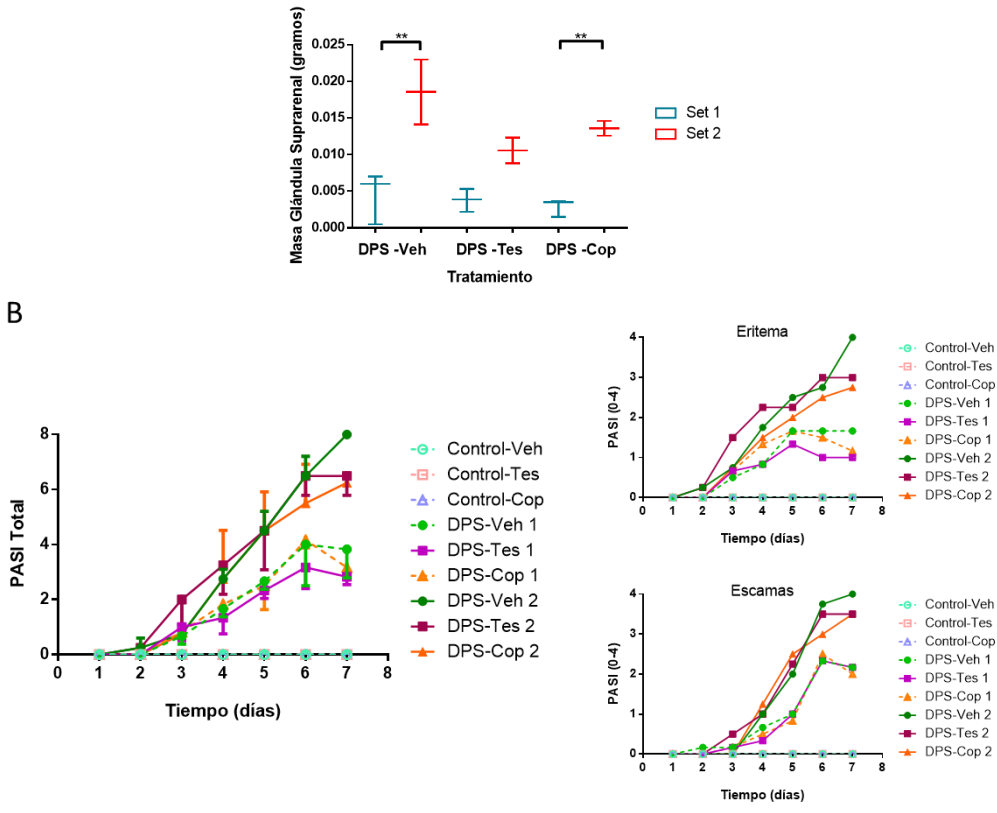


Figura 13. **El estrés exacerba la dermatitis psoriasiforme.** Se colectó luego de la eutanasia las glándulas suprarrenales de los individuos, se pesaron y se obtuvo un promedio de las dos por animal. A. Gráfico de barras muestra la masa de la glándula suprarrenal de los ratones psoriásicos del set 1 (DPS-Veh, DPS-Tes y DPS-Cop) y el set 2 (DPS-Veh2, DPS-Tes2 y DPS-Cop2) ( $p < 0,05$ ). B. A la izquierda se muestra gráfico de PASI Total por día, a la derecha los parámetros independientes que componen el PASI total (escamas y eritema). A. Test Tukey  $\alpha < 0,05$ . B. Mann-Whitney  $P > 0,05$ .

## 5. DISCUSIÓN

La psoriasis es una enfermedad autoinmune crónica que en los últimos años ha tenido un gran interés por parte del mundo científico, tanto para conocer cuáles son los factores gatillantes (ambientales, genéticos, estrés), cómo se desarrolla, así como también para establecer los tratamientos apropiados. En esta investigación se abordó el efecto de la testosterona como potencial inmunomodulador en la psoriasis. En lo que se refiere a Latinoamérica, Chile es uno de los países que presenta más casos de psoriasis junto a Uruguay, Argentina y Brasil. En nuestro país existen entre 180 mil y 200 mil pacientes con psoriasis de los cuales el 80% suele tener *psoriasis vulgaris*. Actualmente, la psoriasis es una enfermedad que no está considerada en la canasta GES ni en las enfermedades que estudia la encuesta nacional de salud, ni tampoco en otras prestaciones. La psoriasis puede afectar muchos aspectos de la vida de las personas que la padecen, en algunos casos, deteriorando de manera importante su calidad de vida. De ahí la importancia de investigar potenciales inmunomoduladores que puedan convertirse en nuevos tratamientos.

Cuando se habla de si existe una mayor o menor reacción del sistema inmune, por lo general se asocia al sexo del individuo, discutiendo respecto a las hormonas sexuales femeninas (estrógeno) o masculinas (testosterona) (Ahmed, S. y col., 1985). Respecto a lo anterior existen opiniones divididas con relación a si la psoriasis

afecta más a las mujeres que a los hombres, o si los afecta por igual (Griffiths, C. y Barker, J., 2007; Greb, J. y col., 2016). Investigaciones sobre el papel de la testosterona en cuadros inflamatorios y estudios de casos de pacientes con diagnóstico de psoriasis han mostrado que la testosterona tendría un rol inmunomodulador, puesto que, disminuye un cierto set de citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), aumenta otras (IL-10) y algunas se mantienen sin cambio (IL-6) (Kalinchenko, S.Y., y col., 2010; Traish, A. y col., 2018).

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria autoinmune, en donde las DCs cumplen un rol fundamental en el inicio de la enfermedad. Por esta razón, se evaluó si la testosterona podía tener un rol inmunomodulador sobre éstas. Para ello se utilizaron DCs derivadas de médula ósea, diferenciadas con GM-CSF, puesto que, es un modelo celular que se ha ocupado en incontables estudios (Labeur, M. y col., 1999; Brasel, K. y col., 2000; Helft, H. y col., 2015). Aunque siendo un modelo ampliamente utilizado, hay que considerar que dependiendo de si estas células son expuestas solo a GM-CSF o en conjunto, con otras citoquinas, se pueden obtener diferentes cultivos de DCs (Brasel, K. y col., 2000; Helft, H. y col., 2015). Según reportes de Helft y colaboradores los estudios *in vitro* usando BMDC diferenciando únicamente con GM-CSF sin considerar la identidad heterogénea resultante, constituye un problema al momento de analizar e interpretar los resultados obtenidos (Helft, H. y col., 2015). El cultivo de células de médula ósea con GM-CSF

genera dos tipos celulares, ambos CD11c+MHCII+, uno que es espontáneamente maduro que tiene marcadores acotados a dendríticas (CD135, CCR7, CD117) y otro inmaduro, parecido a macrófagos (Helft, H. y col., 2015).

En el cultivo celular es posible que se encontraran macrófagos M1, producto de la diferenciación mediante GM-CSF. Estos presentan los marcadores CD86 y MHC-II en su superficie, a diferencia de los M2, además se sabe que son capaces de secretar IL-6 y TNF- $\alpha$ , pero, estos macrófagos no son activados por agonistas de TLR, por lo que se estaría observando solo la producción y secreción de citoquinas por parte de las DCs. En el caso de TNF- $\alpha$  no se observa modificación en la cantidad de células que lo producen ni la cantidad de citoquina producida y secretada por estas cuando se administra testosterona (Figura 4 H y 5B y C) y tampoco se ve modificada la cantidad de IL-6 secretada (Figura 4H). Por otro lado, el aumento de testosterona afecta la cantidad de células productoras de IL-12 en el grupo que tuvo testosterona en la diferenciación y activación, pero no en el que tuvo testosterona solo en la activación, además se observa que se modifica la producción de esta citoquina, aumentando en aquellas células que se han expuesto tanto en la diferenciación como en la activación a testosterona (Figura 5D-F). Esto es interesante, puesto que se conoce que la IL-12 es requerida para la activación de las células T vírgenes (Ruiz, V. y col., 2014), promoviendo la diferenciación y proliferación de las células T (CD4 y CD8). Además, evoca

propiedades inmunorreguladoras potentes mediante la promoción de la diferenciación celular de célula T helper CD4 (Th1), inhibiendo la diferenciación CD4 (Th2) promoviendo la producción de IFN por las células inmunes (Walter, M.J., 2006). Por otro lado, la IL-12 origina la activación y sobrevivencia de las DCs, esto último, promoviendo la localización nuclear del factor nuclear kB, que provoca un aumento en la producción de IL-12 (Lotze, M. y Kalinski, P., 2003).

En resumen, los resultados sugieren que la testosterona en las DCs no estaría generando un rol inmunomodulador que protege de la enfermedad, puesto que, suscita la sobrevivencia de las DCs presentes en la piel y la diferenciación de las células T mediante el aumento de la producción de IL-12. Por otro lado, es conocido que la IL-12 inhibe la angiogénesis en los ratones mediante la inducción de IFN- $\gamma$  (Lotze, M. y Kalinski, P., 2003), por lo que la testosterona podría estar ejerciendo un rol protector que se traduciría en una disminución del eritema en las placas psoriásicas, aspecto que no se observa en la tinción tricrómica de los cortes de piel de individuos psoriásicos (Figura 8A). Estos resultados preliminares sugieren que la testosterona podría tener un rol en la psoriasis, pero hace falta evaluar la producción de IL-12 a través de otros métodos, como ELISA, para confirmar este resultado e indagar en los resultados de las poblaciones celulares de la piel y el bazo en el modelo *in vivo*.

En relación con la cantidad de células que presentan los marcadores CD11c, CD86 y MHC-II no podemos tener certeza de que sean solo DC, por lo que cualquier comparación en cuanto a diferenciación y activación también incluye a los macrófagos. Lo que se observó es que no hay un cambio en la cantidad de células que se diferencian y activan (Figura 4A-G), por lo que se concluye que la testosterona no provocaría una disminución de las poblaciones de DC y macrófagos.

Lo anterior abre la incógnita de qué poblaciones y/o producción y/o secreción de citoquinas se estaría viendo afectada por la administración de testosterona. Existen estudios en los que se ha mostrado que la administración de testosterona genera una mejora en las lesiones psoriásicas (Cemil, B. y col., 2015; Saad, F. y col., 2016; Eltaweel, A. y col., 2018), pero no se ha profundizado en el tema. Debido a esto, se planteó un estudio indagatorio para conocer que ocurre en la psoriasis a nivel macroscópico y microscópico. Para este fin se utilizó un modelo ampliamente ocupado y aceptado de inducción de dermatitis psoriasiforme, el modelo de inducción mediante IMQ (Van der Fits, L. y col., 2009; Ueyama, A. y col., 2014; Onderdijk, A. y col., 2017; Jabeen, M. y col., 2020; Fenix, K. y col., 2020).

Se sabe que el IMQ es un agonista de TLR7 y 8 y que la subsecuente activación de NFκB da como resultado la inducción de citoquinas (Suzuki, H. y col., 2000; Dahl, M., 2002), quimioquinas y otros

mediadores, llevando así a la activación de células presentadoras de antígeno y la posterior activación de células T (Schön, M. p. y Schön, M., 2007). Las LCs se activan y migran desde el día 2 de la aplicación tópica de IMQ (Suzuki, H. y col., 2000), esto se condice fuertemente con lo observado en el PASI, en donde los primeros signos de inducción de dermatitis psoriasiforme se observan al día 3 (Figura 6B y D), día en el que ya habría infiltración en la zona producto de la activación de las LCs. Suzuki y colaboradores mencionan que al día 10 hay una disminución de un 43% de estas células (Suzuki, H. y col., 2000), lo que se relaciona con la disminución de células CD11c+ que se observó en los individuos psoriásicos al día 7 (Figura 12C).

Esta activación y comunicación entre sistema inmune innato y adaptable provoca varios cambios a nivel sistémico. En primer lugar, si observamos que está sucediendo en el bazo, un órgano linfóide secundario, esperaríamos ver que ya haya expansión de las células T. Interesantemente, tanto las células TCD4 como las TCD8 disminuyen en los individuos psoriásicos (Figura 10A-C), efecto que ya se había reportado por Van der Fits y colaboradores (Van der Fits, L. y col., 2009). Además, ellos mencionan que encontraron niveles de producción de IL-17 aumentados en las células TCD4 de los individuos psoriásicos, esto avala la tendencia al aumento que se observa en los resultados obtenidos (Figura 11A-B) y que los niveles de producción de IFN- $\gamma$  apenas aumentaron, resultado que también se observa en esta investigación (Figura 11 A y C).



Adicionalmente, en el estudio se menciona la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  por las células TCD8, por lo que se esperaba que IL-17 aumentara un poco e IFN- $\gamma$  en gran cantidad, pero esto no se observó (Figura 11D-F). Estos resultados sugieren que la producción de citoquinas y la cantidad de células que componen las poblaciones del bazo no son modificadas significativamente por un aumento de la testosterona a nivel sistémico.

La activación de los linfocitos T y el aumento en la producción de algunas citoquinas, como la IL-17 e IL-22, producen cambios en la piel de los individuos psoriásicos. Estas citoquinas actúan directamente en los queratinocitos promoviendo la producción de IL-8 e IL-6 mediante la IL 17, que posteriormente provoca el reclutamiento de células a la zona (Dahl, M., 2002; Gao, J. y col., 2020), lo que se conoce como infiltrado celular (Figura 7C). Así mismo, observamos que la IL-22 promueve la proliferación de los queratinocitos generando un engrosamiento de la epidermis y retención del núcleo por parte de los queratinocitos producto de la alta tasa de proliferación (Figura 7A), efecto que también se observa a nivel macroscópico, en lo que se describen como escamas en la piel de ratón (Figura 6A y D). Lo interesante, es que el día 7 se observa en las escamas una leve separación de los grupos que tienen un aumento de la testosterona con respecto al control (Figura 6D). Jabeen y colaboradores en su investigación mencionan que al día 6 la inducción de dermatitis psoriasiforme por IMQ se observa en la piel la aparición en una alta cantidad de la proteína

STAT3 (Jabeen, M. y col., 2020). Esta proteína tiene directa relación con la proliferación de los queratinocitos, ya que se ha observado que la señalización de IL-22/STAT3 puede inducir CDC6, proteína que tiene un rol importante en la proliferación, puesto que su eliminación lleva a una disminución en esta (Sun, S. y col., 2019). Los resultados del día 7 (día de la eutanasia) sugieren que la testosterona estaría actuando a nivel de los queratinocitos, una línea investigativa que se propone explorar en el futuro.

En la literatura es posible encontrar esta relación respecto a otros tipos celulares como las células prostáticas, cardiomiocitos y células del túbulo renal (Wang, M. y col., 2009; Reed D. y Arany, I., 2014; Ho, C. y col., 2020). En estos, se ha mostrado que la testosterona provoca una disminución en la expresión y activación de STAT3, provocando diversos efectos que dependen del tipo celular. Lo anterior nos lleva a sugerir que la testosterona podría estar efectuando un papel en la protección de la psoriasis, como se ha visto en los estudios de casos (Cemil, B. y col., 2015; Eltaweel, A. y col., 2018), regulando la vía de STAT3 en los queratinocitos (Inui, S. y col., 2000; Lai, J. y col., 2012; Ceruti, J. y col., 2018). Particularmente, STAT3 se inhibiría en presencia de testosterona, lo que llevaría a que se apague la vía. Lo anteriormente descrito tendría como consecuencia una disminución de Ciclina D y por consecuencia, una disminución de la proliferación de los queratinocitos lo que se traduce en una mejora

visual en las placas psoriásicas (Figura 14). Para probar esta hipótesis en primer lugar se propone realizar inmunohistoquímica en la piel de ratón con anticuerpo contra STAT3 y STAT3 fosforilado. Lo anterior con la finalidad de comprobar que sea STAT3 la proteína que se ve afectada o si este efecto ocurre a nivel del receptor o en otra proteína de esta vía. En segundo lugar, se propone evaluar la presencia o ausencia de blancos río abajo de la cascada que son relevantes en la proliferación de los queratinocitos, como lo es CDC6.

Los queratinocitos no solo reciben señales para proliferar, también hay señalización que provoca la producción y secreción de citoquinas, como lo son TNF- $\alpha$  e IL-6. Se ha reportado que ambas citoquinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) son producidas por las DCs, por ello, se observó que ocurría con su producción y/o secreción *in vitro*. En la literatura es conocido que TNF- $\alpha$  es importante en el desarrollo de la psoriasis y que la IL-6 secretada por los queratinocitos, entre otros tipos celulares, contribuye al reclutamiento de otras células del sistema inmune a la zona, es por esto por lo que cobra importancia saber que sucede en cuanto a la secreción de estas citoquinas en la piel.

Se observó que la IL-6 disminuye en los individuos psoriásicos que tienen un aumento de la testosterona, este fenómeno ya había sido reportado por Saad y Thompson (Saad, F. y col., 2016; Thompson, M. y col., 2017). En ellos se informa que la administración de

testosterona *in vivo* e *in vitro* disminuye los niveles de IL-6. Esta citoquina está involucrada en varios sucesos, por lo que se habla que tiene efectos tanto anti como proinflamatorios (Ward, N., 2006). Existen estudios que han mostrado que inhibe la producción de TNF- $\alpha$  (Ward, N., 2006), pero además tiene un rol en inducir la proliferación de las células T y en la fase tardía de la activación de células B, llevando a la producción y secreción de anticuerpos. Dado lo variado de su acción y que solo miramos al día 7 es difícil estimar que está sucediendo con exactitud. Lo que sugieren estos resultados es que la IL-6 disminuida en los ratones psoriásicos no tiene un efecto inhibitorio en TNF- $\alpha$  en este modelo de inducción por IMQ en la piel, por lo que sería interesante que se pueda estudiar que ocurre día a día en este modelo de inducción en cuanto a esta citoquina y la testosterona. También es posible que el aparente potencial de la testosterona de modular el sistema inmune sea en realidad el resultado de una relación cercana entre este andrógeno y otras hormonas asociadas al estrés, como la corticosterona. En esta tesis no se realizaron análisis que involucren el efecto del estrés. Sin embargo, es posible inferir a partir de la temporalidad que se llevaron a cabo los experimentos. En esta investigación el estrés observado corresponde a la diferencia existente entre el primer set experimental y el segundo. Este último debido a la pandemia tiene una separación de 10 meses con el primero, tiempo en el cual ha disminuido el ruido exterior y la cantidad de personal que visita

el bioterio. Lo anterior tuvo por efecto un aumento del peso de la glándula suprarrenal, relación que se ha observado en ratas, tiene directa incidencia en el estado de estrés del individuo (Ulrich-Lai, Y. y col., 2006). Queda pendiente explorar la relación del potencial efecto inmunomodulador de la testosterona en cuanto a su compleja interacción con otras hormonas.

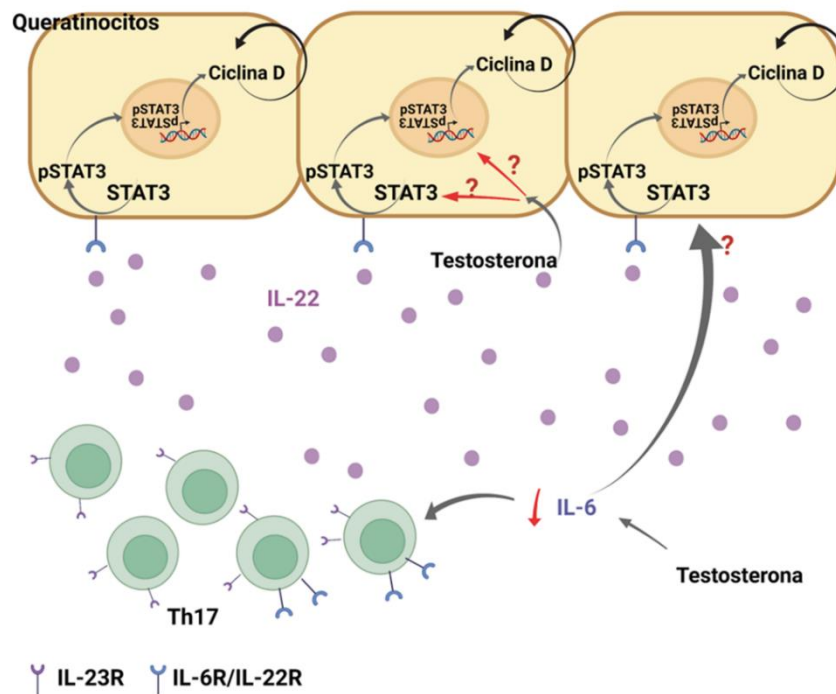


Figura 14. **Propuesta de modelo acción de la testosterona en la enfermedad de psoriasis.** La Testosterona podría estar realizando su acción por dos vías posibles. Por un lado, podría ingresar al queratinocito y actuar sobre STAT3 disminuyendo su activación y/o producción. La disminución de STAT3 provocaría una disminución de Ciclina D lo que llevaría a una disminución en la proliferación de los queratinocitos. Por otro lado, la testosterona podría actuar en la disminución de IL-6 en la zona inflamada. IL-6 es una citoquina involucrada en la expresión del receptor de IL-23 en los linfocitos Th17, lo que a su vez provocaría una disminución de las citoquinas que producen y secretan estos linfocitos, como IL-22. Lo anterior se traduciría en una menor tasa de proliferación de los queratinocitos debido a la disminución de IL-22 en la zona, lo que a nivel de los queratinocitos se reflejaría en una disminución de la activación de la vía de STAT3-STAT3P. Las células de los extremos representan lo que ocurre en la psoriasis en los queratinocitos, en tanto la célula central representa lo que ocurriría en estas células si son expuestas a testosterona.

## 6. CONCLUSIÓN

La presente investigación sobre el efecto de la testosterona en la respuesta a la inducción de psoriasis permite concluir sobre la base de los experimentos realizados *in vitro* que la diferenciación y activación de las DC no es modulada por la testosterona. Además, se observó que no modifica la producción de TNF- $\alpha$  por parte de estas células. Por otro lado, en el estudio *in vivo* se evidenció que la cantidad de células que componen las poblaciones inmunes de interés (DC, linfocitos TCD4 y CD8) no fueron afectadas por la administración de testosterona. No obstante, se encontró un efecto a nivel de algunas citoquinas secretadas en la piel, tales como TNF- $\alpha$  e IL-6, las que podrían tener un papel en el efecto inmunomodulador de la testosterona. Es posible que estas citoquinas sean secretadas por otras poblaciones de interés presentes en la piel, como los queratinocitos. Por lo que sería importante explorar en el futuro si la testosterona este ejerciendo un rol a este nivel.

## 7. Proyecciones

- Medir niveles sanguíneos de testosterona en machos. Medir tanto en machos control (sin tratamiento) como en machos que reciben inyección vehículo de testosterona o inyección de testosterona.
- Considerar una mayor dosis de testosterona o en su defecto más de una inyección de testosterona a los individuos.
- Tener un grupo control de actividad de la testosterona, en donde se midan parámetros que estén relacionados con el funcionamiento de esta (por ejemplo, activación de genes blanco).
- Comprobar el efecto en la secreción de citoquinas, considerar complementar con ELISA la medición de citoquinas secretadas, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*.
- Analizar otras poblaciones celulares como queratinocitos y células T $\gamma\delta$ , ya que la testosterona podría estar ejerciendo un rol en otras poblaciones de la piel.
- Analizar la producción y secreción de otras citoquinas que son relevantes para la enfermedad como IL-23.
- Evaluar el efecto de la testosterona en un modelo de inducción más prolongado, emulando la enfermedad crónica, y no aguda como se realizó en esta investigación.
- Evaluar durante el modelo de inducción por IMQ a diario si las citoquinas secretadas en la piel, particularmente en las

que se observaron cambios en esta investigación, se mantienen o varían durante la inducción.

- Medir IL-12 en el modelo de inducción por IMQ, puesto que se ha reportado que inhibe la angiogénesis y en esta investigación (en el experimento *in vitro*) se observó una tendencia al aumento en su producción, particularmente en el grupo que tuvo testosterona durante la activación y diferenciación de las DCs.
- Observar en la piel de los ratones psoriásicos si la testosterona provoca una disminución de lo que se han descrito como vasos sanguíneos tortuosos (Micali, G. y col., 2010) en la enfermedad de psoriasis.
- Considerando que en los últimos años se ha reportado que el sistema nervioso es un elemento importante en la psoriasis (Zhang, X. y He, Y., 2020), considerar este aspecto como un parámetro más de la evaluación de la psoriasis y observar si la testosterona podría tener alguna acción a este nivel.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S., Penhale, W. y Talal, N.** 1985 "Sex Hormones, Immune Responses, and Autoimmune Disease" Am J Pathol. Vol. 121, N°3
- Allam, J. P., Bunzek, C., Schnell, L., Heltzel, M., Weckbecker, L., Wilsmann-Theis, D., Brendes, K., Haidl, G. y Novak, N.** 2019 "Low Serum Testosterone Levels in Male Psoriasis Patients Correlate with Disease Severity." Eur J Dermatol 29, no. 4: 375-82. <https://doi.org/10.1684/ejd.2019.3605>.
- Bender, A.T., Tzvetkov, E., Pereira, A., Wu, Y., Kasar, S., Przetak, M., Vlach, J., Niewold, T., Jensen, M. y Okitsu, S.L.** 2020 "TLR7 and TLR8 differentially activate the IRF and NF-κB pathways in specific cell types to promote inflammation" ImmunoHorizons. 4 (2) 93-107; DOI: <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2000002>
- Biswas, S. K., y Mantovani, A.** 2010 "Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subtypes: Cancer as a Paradigm." Nat Immunol 11, no. 10: 889-96. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>.
- Cemil, B. C., Cengiz, F. P., Atas, H., Ozturk, G. y Canpolat, F.** 2015 "Sex Hormones in Male Psoriasis Patients and Their Correlation with the Psoriasis Area and Severity Index." J Dermatol 42, no. 5: 500-3. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12803>.

**Ceruti, J., Leirós, G. y Balañá, M.** 2018 "Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles" *Molecular and Cellular Endocrinology*. Volume 465, Pages 122-133.

**Chen, C. W., Jian, C. Y., Lin, P. H., Chen, C. C., Lieu, F. K., Soong, C., Hsieh, C. C. y col.** 2016 "Role of Testosterone in Regulating Induction of Tnf-Alpha in Rat Spleen Via Erk Signaling Pathway." *Steroids* 111: 148-54.  
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.03.007>.

**Dahl, M. V.** 2002 "Imiquimod: A Cytokine Inducer." *J Am Acad Dermatol* 47, no. 4 Suppl: S205-8.  
<https://doi.org/10.1067/mjd.2002.126586>.

**El Malki, K., Karbach, S. H., Huppert, J., Zayoud, M., Reissig, S., Schuler, R., Nikolaev, A. y col.** 2013 "An Alternative Pathway of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in the Absence of Interleukin-17 Receptor a Signaling." *J Invest Dermatol* 133, no. 2: 441-51. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.318>.

**Eltaweel, Aei, Mustafa, A. I., El-Shimi, O. S., y Algaod, F. A.** 2018 "Sex Hormones, Erectile Dysfunction, and Psoriasis; a Bad Friendship!". *Int J Dermatol* 57, no. 12: 1481-84.  
<https://doi.org/10.1111/ijd.14178>.

**Fenix, K., Wijesundara, D. K., Cowin, A. J., Grubor-Bauk, B. y Kopecki, Z.** 2020 "Immunological Memory in Imiquimod-Induced Murine

Model of Psoriasiform Dermatitis." *Int J Mol Sci* 21, no. 19.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21197228>.

**Gao, J., Chen, F., Fang, H., Mi, J., Qi, Q. y Yang, M.** 2020  
"Daphnetin Inhibits Proliferation and Inflammatory Response in  
Human Hacat Keratinocytes and Ameliorates Imiquimod-Induced  
Psoriasis-Like Skin Lesion in Mice." *Biol Res* 53, no. 1: 48.  
<https://doi.org/10.1186/s40659-020-00316-0>.

**Glitzner, E., Korosec, A., Brunner, P. M., Drobits, B., Amberg,  
N., Schonthaler, H. B., Kopp, T. y col.** 2014 "Specific Roles for  
Dendritic Cell Subtipos During Initiation and Progression of  
Psoriasis." *EMBO Mol Med* 6, no. 10: 1312-27.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201404114>.

**Greb, J. E., Goldminz, A. M., Elder, J. T., Lebwohl, M. G.,  
Gladman, D. D., Wu, J. J., Mehta, N. N., Finlay, A. Y. y Gottlieb,  
A. B.** 2016 "Psoriasis." *Nat Rev Dis Primers* 2: 16082.  
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.82>.

**Griffiths, C. E., y Barker, J.** 2007 "Pathogenesis and Clinical  
Features of Psoriasis." *The Lancet* 370, no. 9583: 263-71.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61128-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61128-3).

**Grine, L., Dejager, L., Libert, C. y Vandenbroucke, R. E.** 2015  
"Dual Inhibition of Tnfr1 and Ifnar1 in Imiquimod-Induced  
Psoriasiform Skin Inflammation in Mice." *J Immunol* 194, no. 11:  
5094-102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403015>.

**Helft, J., Bottcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., Goubau, D. y Reis e Sousa, C.** 2015 "Gm-Csf Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of Cd11c(+)Mhcii(+) Macrophages and Dendritic Cells." *Immunity* 42, no. 6: 1197-211. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018>.

**Ho, C. H., Lu, Y. C., Fan, C. K., Yu, H. J., Liu, H. T., Wu, C. C., Chen, K. C., Liu, S. P. y Cheng, P. C.** 2020 "Testosterone Regulates the Intracellular Bacterial Community Formation of Uropathogenic Escherichia Coli in Prostate Cells Via Stat3." *Int J Med Microbiol* 310, no. 7: 151450. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151450>.

**Horváth, S., Kemény, A., Pintér, E. y Gyulai, R.** 2020 "A localized Aldara (5% Imiquimod)-Induced Psoriasiform Dermatitis Model in Mice using finn chambers" *Current Protocols in Pharmacology* Volume 90, Issue 1 e78

**Huang, X., Li, Y., Fu, M. y Xin, H. B.** 2018 "Polarizing Macrophages in Vitro." *Methods Mol Biol* 1784: 119-26. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_12).

**Inui, S., Itami, S., Pan, H-J. y Chang, C.** 2000 "Lack of androgen receptor transcriptional activity in human keratinocytes" *Journal of Dermatological Science*. Volume 23, Issue 2, Pages 87-92.

**Jabeen, M., Boisgard, A. S., Danoy, A., El Kholti, N., Salvi, J. P., Boulieu, R., Fromy, B., Verrier, B. y Lamrayah, M.** 2020

"Advanced Characterization of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Mouse Model." *Pharmaceutics* 12, no. 9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090789>.

**Joffre, O., Nolte, M.A., Spörri, R. y Sousa, C.R.e.** 2009 Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227: 234-247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x>

**Kalinchenko, S. Y., Tishova, Y. A., Mskhalaya, G. J., Gooren, L. J., Giltay, E. J. y Saad, F.** 2010 "Effects of Testosterone Supplementation on Markers of the Metabolic Syndrome and Inflammation in Hypogonadal Men with the Metabolic Syndrome: The Double-Blinded Placebo-Controlled Moscow Study." *Clin Endocrinol (Oxf)* 73, no. 5: 602-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03845.x>.

**Kim, T. G., Kim, S. H. y Lee, M. G.** 2017 "The Origin of Skin Dendritic Cell Network and Its Role in Psoriasis." *Int J Mol Sci* 19, no. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms19010042>.

**Labeur, M., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T., Schwarz, T. y Grabbe, S.** 1999 "Generation of Tumor Immunity by Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Correlates with Dendritic Cell Maturation Stage" *The Journal of Immunology* 1, 162 (1) 168-175.

**Lai, J-J., Chang, P., Lai, K-P., Chen, L. y Chang, C.** 2012 "The role of androgen and androgen receptor in skin-related disorders" Arch Dermatol Res, 304:499-510.

**Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. y col.** 2000 Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol 1, 311-316. <https://doi.org/10.1038/79758>

**Lotze, M. y Kalinski, P.** 2003" Interleukin- 12 Family Members"

**Ludescher, B., Najib, A., Baar, S., Machann, J., Schick, F., Buchkremer, G., Claussen, C. D. y Eschweiler, G. W.** 2008 "Increase of Visceral Fat and Adrenal Gland Volume in Women with Depression: Preliminary Results of a Morphometric Mri Study." Int J Psychiatry Med 38, no. 3, 229-40. <https://doi.org/10.2190/PM.38.3.a>.

**Marinoni, B., Ceribelli, A., Massarotti, M. S., y Selmi, C.** 2014 "The Th17 Axis in Psoriatic Disease: Pathogenetic and Therapeutic Implications." Auto Immun Highlights 5, no. 1: 9-19. <https://doi.org/10.1007/s13317-013-0057-4>.

**Micali, G., Lacarrubba, F., Musumeci, M., Massimino, D. y Nasca, R.** 2010 "Cutaneous vascular patterns in psoriasis" The International Society of Dermatology. 49, 249-256.

**Ogawa, E., Sato, Y., Minagawa, A. y Okuyama, R.** 2018 "Pathogenesis of Psoriasis and Development of Treatment." J Dermatol 45, no. 3: 264-72. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14139>.

**Onderdijk, A. J., Hekking-Weijma, I. M., Florencia, E. F. y Prens, E. P.** 2017 "Surgical Denervation in the Imiquimod-Induced Psoriasiform Mouse Model." *Methods Mol Biol* 1559: 75-81. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5_6).

**Reed, D. y Arany, I.** 2014 "Sex Hormones Differentially Modulate STAT3-dependent antioxidant responses during oxidative stress in renal proximal tubule cells" *in vivo* 28: 1097-1100.

**Rousset, L. y Halioua, B.** 2018 "Stress and Psoriasis." *Int J Dermatol* 57, no. 10, 1165-72. <https://doi.org/10.1111/ijd.14032>.

**Ruiz Cañas, V., Velásquez Lopera, M., y Barrera Robledo, L.** 2014 "Aspectos Inmunogenéticos De La Psoriasis Con Énfasis En Micro-Arn." *Inmunología* 33, no. 4: 137-46. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2014.07.002>.

**Saad, F., Haider, A. y Gooren, L.** 2016 "Hypogonadal Men with Psoriasis Benefit from Long-Term Testosterone Replacement Therapy - a Series of 15 Case Reports." *Andrologia* 48, no. 3: 341-6. <https://doi.org/10.1111/and.12452>.

**Schon, M. P., y Schon, M.** 2007 "Imiquimod: Mode of Action." *Br J Dermatol* 157 Suppl 2: 8-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x>.

**Segura, E.** 2016 "Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subtipos." *Methods Mol Biol* 1423: 3-15. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3606-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3606-9_1).

**Singh, T. P., Zhang, H. H., Borek, I., Wolf, P., Hedrick, M. N., Singh, S. P., Kelsall, B. L., Clausen, B. E. y Farber, J. M.** 2016 "Monocyte-Derived Inflammatory Langerhans Cells and Dermal Dendritic Cells Mediate Psoriasis-Like Inflammation." *Nat Commun* 7: 13581. <https://doi.org/10.1038/ncomms13581>.

**Singh, T. P., Zhang, H. H., Hwang, S. T. y Farber, J. M.** 2019 "IL-23- and Imiquimod-Induced Models of Experimental Psoriasis in Mice." *Curr Protoc Immunol* 125, no. 1: e71. <https://doi.org/10.1002/cpim.71>.

**Sun, S., Zhang, X., Xu, M., Zhang, F., Tian, F., Cui, J., Xia, Y. y col.** 2019 "Berberine Downregulates Cdc6 and Inhibits Proliferation Via Targeting Jak-Stat3 Signaling in Keratinocytes." *Cell Death Dis* 10, no. 4: 274. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1510-8>.

**Suzuki, H., Wang, B., Shivji, G. M., Toto, P., Amerio, P., Tomai, M. A., Miller, R. L. y Sauder, D. N.** 2000 "Imiquimod, a Topical Immune Response Modifier, Induces Migration of Langerhans Cells." *J Invest Dermatol* 114, no. 1: 135-41. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00833.x>.

**Teunissen, M. B. M., Yeremenko, N. G., Baeten, D. L. P., Chielie, S., Spuls, P. I., de Rie, M. A., Lantz, O. y Res, P. C. M.** 2014 "The IL-17a-Producing CD8+ T-Cell Population in Psoriatic Lesional Skin Comprises Mucosa-Associated Invariant T Cells and



Conventional T Cells." *J Invest Dermatol* 134, no. 12: 2898-907.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.261>.

**Thompson, M. G., Peiffer, D. S., Larson, M., Navarro, F. y Watkins, S. K.** 2017 "Foxo3, Estrogen Receptor Alpha, and Androgen Receptor Impact Tumor Growth Rate and Infiltration of Dendritic Cell Subtipos Differentially between Male and Female Mice." *Cancer Immunol Immunother* 66, no. 5: 615-25.  
<https://doi.org/10.1007/s00262-017-1972-4>.

**Traish, A., Bolanos, J., Nair, S., Saad, F. y Morgentaler, A.** 2018 "Do Androgens Modulate the Pathophysiological Pathways of Inflammation? Appraising the Contemporary Evidence." *J Clin Med* 7, no. 12. <https://doi.org/10.3390/jcm7120549>.

**Ueyama, A., Yamamoto, M., Tsujii, K., Furue, Y., Imura, C., Shichijo, M. y Yasui, K.** 2014 "Mechanism of Pathogenesis of Imiquimod-Induced Skin Inflammation in the Mouse: A Role for Interferon-Alpha in Dendritic Cell Activation by Imiquimod." *J Dermatol* 41, no. 2: 135-43. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12367>.

**Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C. y Herman, J. P.** 2006 "Chronic Stress Induces Adrenal Hyperplasia and Hypertrophy in a Subregion-Specific Manner." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, no. 5: E965-73.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2006>.

**Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F. y col.** 2009 "Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated Via the IL-23/IL-17 Axis." *J Immunol* 182, no. 9: 5836-45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802999>.

**Volaric, I., Vičić, M. y Prpić-Massari, L.** 2019 "The Role of Cd8+ T-Cells and their Cytokines in the Pathogenesis of Psoriasis." *Acta Dermatovenerologica Croatica*. 27(3):159-162.

**Wagner, E. F., Schonhaler, H. B., Guinea-Viniegra, J. y Tschachler, E.** 2010 "Psoriasis: What We Have Learned from Mouse Models." *Nat Rev Rheumatol* 6, no. 12: 704-14. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.157>.

**Walter, M.J.** 2006 *Encyclopedia of respiratory medicine*. En Laurent, G.J. y Shapiro, S.D.(Ed), IL-12, pp 994-999. Elsevier Gezondheidszorg

**Wang, A., y Bai, Y.** 2020 "Dendritic Cells: The Driver of Psoriasis." *J Dermatol* 47, no. 2: 104-13. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15184>.

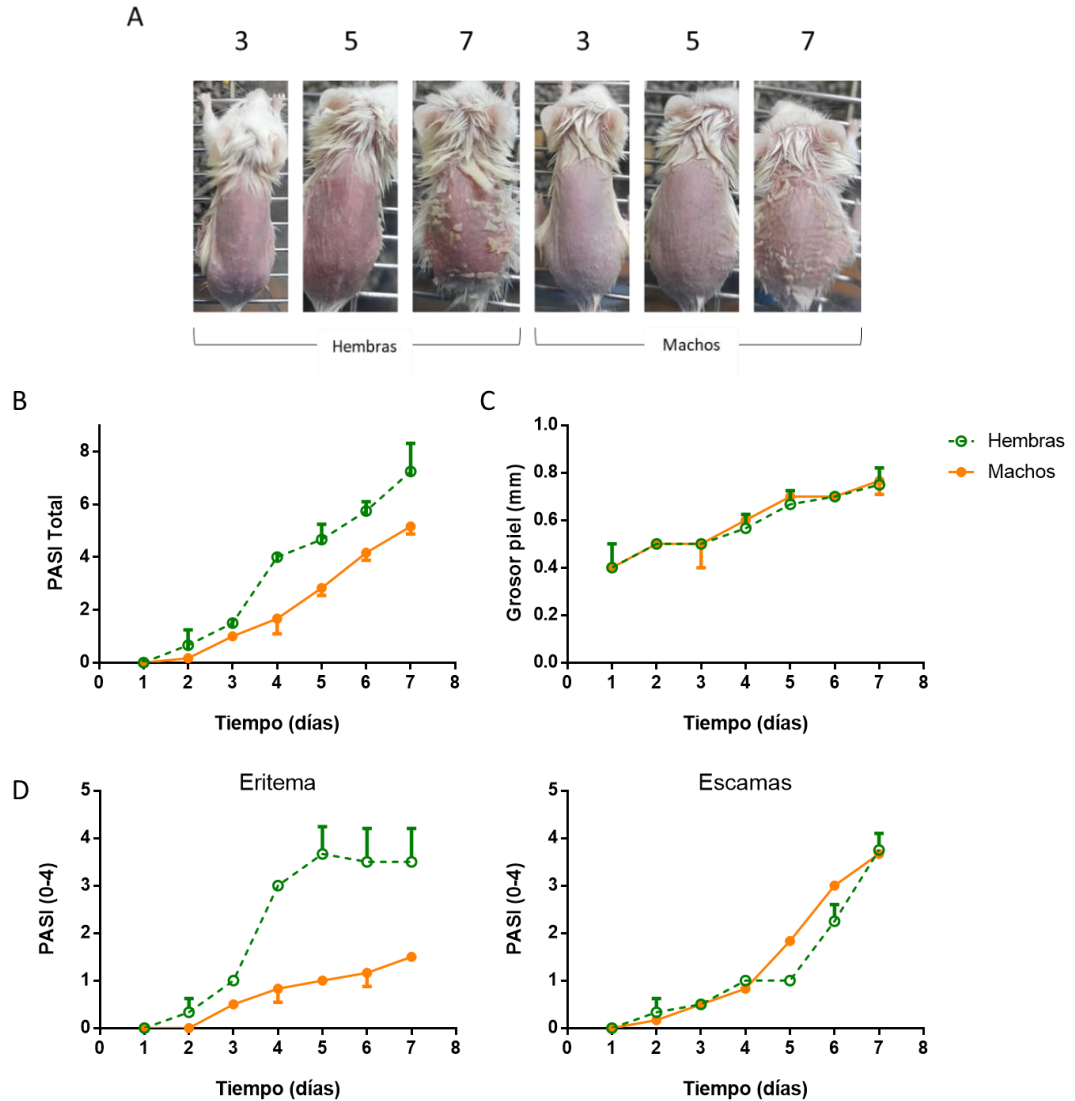
**Wang, M., Wang, Y., Abarbanell, A., Tan, J., Weil, B., Herrmann, J. y Meldrum, D. R.** 2009 "Both Endogenous and Exogenous Testosterone Decrease Myocardial Stat3 Activation and Socs3 Expression after Acute Ischemia and Reperfusion." *Surgery* 146, no. 2: 138-44. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.03.035>.

**Ward, N.** 2006 Encyclopedia of respiratory medicine. En Laurent, G.J. y Shapiro, S.D.(Ed), IL-6, pp 980-982. Elsevier Gezondheidszorg.

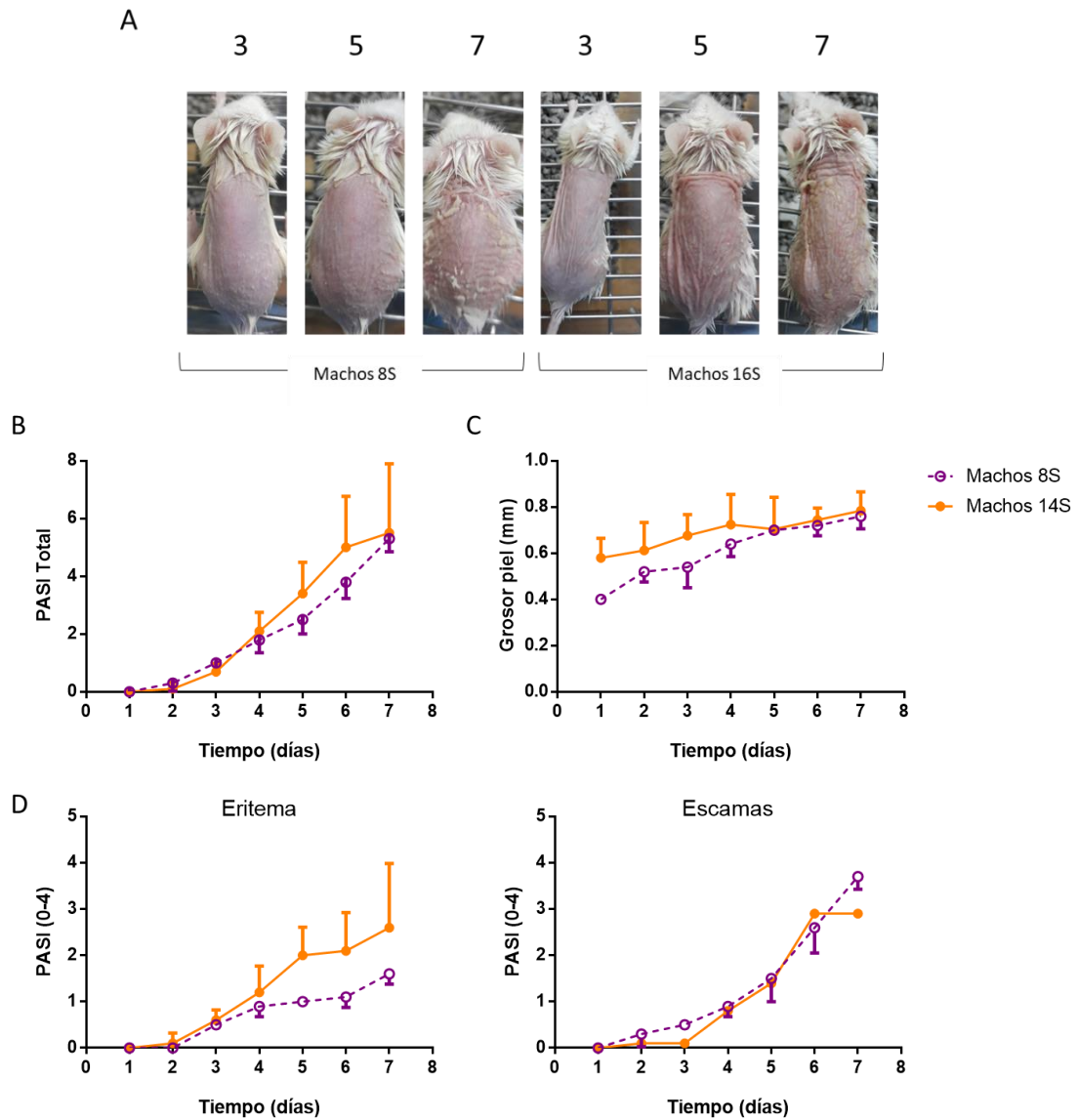
**Yao, Y., Xu, X. H. y Jin, L.** 2019 "Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy." Frontiers in Immunology 10: 792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>.

**Zhang, X. y He, Y.** 2020 "The Role of Nociceptive Neurons in the Pathogenesis of Psoriasis" Frontiers in Immunology. Volumen 11.

## 9. Anexos



**Figura 15. Comparación de la evolución de las características psoriásicas medidas como PASI y grosor de piel entre los individuos psoriásicos hembra y macho de la misma edad.** Se aplicó IMQ durante 6 días en el dorso depilado de los ratones. Durante este periodo se tomó registro del eritema, escamas y grosor de piel, incluyendo el día de la eutanasia en la caracterización. A. Se muestran fotografías representativas correspondientes a los cambios morfológicos en la piel de la zona dorsal de los ratones a los días 3, 5 y 7 (día de eutanasia) para machos y hembras. B. Gráfico muestra PASI total de los 6 días (días 1-6) de tratamiento y el día de eutanasia (día 7) para machos y hembras. C. Gráfico muestra el grosor de piel de los 6 días (días 1-6) de tratamiento y el día de eutanasia (día 7) para machos y hembras. D. Gráficos muestran los parámetros independientes que componen el PASI total; a la izquierda se muestra la cantidad de eritema y el de la derecha muestra la cantidad de escama, ambos con una escala de 1-4. Ratones DPS hembras y machos n=3. Mann-Whitney  $P > 0,05$ .



**Figura 16. Comparación de la evolución de las características psoriásicas medidas como PASI y grosor de piel entre los individuos psoriásicos machos de diferente edad.** Se aplicó IMQ durante 6 días en el dorso depilado de los ratones. Durante este periodo se tomó registro del eritema, escamas y grosor de piel, incluyendo el día de la eutanasia en la caracterización. A. Se muestran fotografías representativas correspondientes a los cambios morfológicos en la piel de la zona dorsal de los ratones a los días 3, 5 y 7 (día de eutanasia) para los dos grupos. B. Gráfico muestra PASI total de los 6 días (días 1-6) de tratamiento y el día de eutanasia (día 7) para los dos grupos. C. Gráfico muestra el grosor de piel de los 6 días (días 1-6) de tratamiento y el día de eutanasia (día 7) para los dos grupos. D. Gráficos muestran los parámetros independientes que componen el PASI total; a la izquierda se muestra la cantidad de eritema y el de la derecha muestra la cantidad de escama, ambos con una escala de 1-4. Ratones DPS machos 8S y 14S con n=5. Mann-Whitney  $P > 0,05$ .