



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“Uso de una matriz biopolimérica
complementada con medio condicionado de
células troncales mesenquimáticas de la gelatina
de Wharton en reparación de lesiones
psoriasiformes”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Natalie Macarena Edwards Pozo

Director del Seminario de Título:

Dra. Verónica Palma Alvarado

Co-Director

Dra. Daniela Carrillo Rojas

enero 2021



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“Uso de una matriz biopolimérica
complementada con medio condicionado de
células troncales mesenquimáticas de la gelatina
de Wharton en reparación de lesiones
psoriasiformes”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título:

Dra. Verónica Palma Alvarado

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Dra. Daniela Sauma

Evaluador:

Dr. Elías Utreras

Santiago de Chile, enero 2021



Mi nombre es Natalie Macarena Edwards Pozo. Nací el 7 de septiembre de 1996 en Santiago de Chile, siendo hija única de mis padres: María Eugenia Pozo Díaz (chilena) y Walton Edwards Watson (trinitense). Me considero una persona alegre, honesta, soñadora, perseverante, perfeccionista y fan de las cosas dulces. Cursé toda la educación básica y media en el colegio Pedro de Valdivia de Providencia, siendo siempre una alumna destacada, especialmente en los ramos de biología, física y química. Además, participé constantemente en actividades deportivas, perteneciendo a la rama de patinaje artístico durante varios años y más tarde me acerqué al plano artístico por medio de concursos coreográficos. Hacer un resumen de mis intereses es bastante difícil porque me llaman la atención tantas cosas, entre ellas la pastelería, las actividades manuales como la pintura y el mosaico, pero lo que más me apasiona es la danza.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresarles mi gratitud a varias personas. En primer lugar, me gustaría agradecerle a la Dra. Verónica Palma, directora del departamento de biología de la Universidad, por aceptarme como integrante de su laboratorio “VP Lab” y por su buena disposición durante todo este proceso formativo.

A la Dra. Daniela Carrillo por permitir mi integración a su línea de investigación y por haber sido mi guía durante todo este proceso correspondiente a mi ciclo profesional, compartiendo conmigo sus conocimientos respecto a temáticas tanto del laboratorio como de la vida.

A mis compañeros de VP Lab: Bárbara, David, Delia, Edel, Fabiola, Ignacio, Isaac, Joaquín, Tomás, Sofía y Ximena por brindarme ayuda al momento de hacer experimentos, analizar los resultados obtenidos a partir de éstos, entregarme consejos respecto a la vida científica o simplemente por la retroalimentación entregada sobre mi proyecto durante los lab meetings.

Agradecerles a mis amigos de la universidad: Enzo, Felipe, Paula, Sebastián, Tatiana, Vicente y Francisca integrantes de “Cuprica”, por nuestras sesiones de estudio para los ramos más difíciles, además de las risas y experiencias vividas juntos. Pero, sobre todo aprecio las buenas vibras que me dieron cada vez que dudé de mis capacidades durante estos 5 años de vida universitaria.

También quiero reconocer a mi familia, en especial a mi madre por apoyarme incondicionalmente en momentos de estrés, decepción y ansiedad a lo largo de mi carrera. Por alentarme a participar en competencias o instancias multidisciplinarias tal como lo fue la competencia de biología sintética iGEM, experiencia altamente enriquecedora que cambió mi vida y me motivó a seguir creciendo en el ámbito científico.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
Psoriasis	1
Psoriasis Vulgaris.....	2
Fisiopatología de la psoriasis	2
Tratamientos para pacientes psoriásicos	4
Medicina regenerativa.....	6
Células troncales.....	6
Células troncales mesenquimáticas	7
Células troncales mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton.....	11
Medio condicionado - Secretoma de células hWJ MSC	11
Uso de MSC en psoriasis.....	12
Escala PASI	12
Dermatitis psoriasiforme.....	13
Uso de biopolímeros en la medicina regenerativa.....	15
Ácido hialurónico.....	16
Hipótesis	17
Objetivo general	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Cultivo de células hWJ MSC	18
Subcultivos de hWJ MSC.....	18

Análisis de expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo.....	18
Obtención de hWJCM	19
Síntesis de esponjas	19
Ensayo CAM para evaluar angiogénesis <i>in vivo</i>	19
Inducción del modelo murino de dermatitis psoriasiforme	21
Diseño experimental del tratamiento de la dermatitis psoriasiforme	21
Evaluación del efecto terapéutico de los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM mediante índice PASI, índice esplénico, índice hepático y examinación de la piel ..	22
Cuantificación del grosor epidérmico.....	25
Inmunohistoquímica	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS	27
Las células derivadas de la gelatina de Wharton expresan marcadores específicos de MSC	27
El tratamiento HA hWJCM presenta potencial angiogénico en un modelo CAM <i>in vivo</i>	29
Evaluación del potencial terapéutico de hWJCM y HA hWJCM en un modelo de DP	30
DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES	40
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala PASI modificada.....	14
Figura 2. Esquema explicativo de ensayo CAM <i>in vivo</i>	21
Figura 3. Criterio utilizado para la cuantificación de vasos sanguíneos tortuosos.	24
Figura 4. Protocolo experimental.	25
Figura 5. Las hWJ MSC expresan los marcadores CD105, CD90 y CD73 en ausencia de CD45 y CD34.....	28
Figura 6. Las propiedades angiogénicas de hWJCM se mantienen luego del proceso de liofilización.	30
Figura 7. El tratamiento HA hWJCM disminuye el índice PASI y provoca la recuperación del peso corporal	32
Figura 8. El tratamiento de DP con HA hWJCM disminuye el índice PASI de forma aguda al día 7 de tratamiento	33
Figura 9. La administración de los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM disminuye las manifestaciones clínicas de DP.....	34
Figura 10. El tratamiento de DP no revierte la esplenomegalia.....	35
Figura 11. El grosor de la epidermis se reduce frente al tratamiento de DP	36
Figura 12. El tratamiento con HA hWJCM reduce tanto el número de vasos sanguíneos normales como tortuosos y recupera el diámetro de éstos.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Tejido adiposo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ang	Angiopoyetina
ARN	Ácido ribonucleico
bFGF	Factor básico de crecimiento fibroblástico (del acrónimo en inglés, <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BM	Médula ósea (del acrónimo en inglés, <i>bone marrow</i>)
CAM	Membrana corioalantoidea (del acrónimo en inglés, <i>chorioallantoic membrane</i>)
CM	Medio condicionado
CT&BD	Células Troncales y Biología del Desarrollo
Ctrl	Control
DMEM	Medio Dulbecco's modified Eagle
DP	Dermatitis psoriasiforme
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del acrónimo en inglés, <i>epidermal growth factor</i>)
H&E	Hematoxilina y eosina
HA	Ácido hialurónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (del acrónimo en inglés, <i>hepatocyte growth factor</i>)
HIF-1	Factor inducible por hipoxia-1 (del acrónimo en inglés, <i>hypoxia inducible factor-1</i>)

hWJCM	Medio condicionado de células mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton
hWJ MSC	Células troncales mesenquimáticas humanas provenientes de la gelatina de Wharton
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMQ	Imiquimod
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasas de la matriz
MSC	Células troncales mesenquimáticas (del acrónimo en inglés, <i>mesenchymal stem cells</i>)
PLA	Fosfolipasa A
PBS	Buffer fosfato salino
P/S	Mezcla de antibióticos Penicilina-Estreptomicina
SFB	Suero Fetal Bovino
SRF	Sin rojo fenol
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (del acrónimo en inglés, <i>transforming growth factor beta</i>)
TLR	Receptor de tipo Toll (del acrónimo en inglés, <i>toll like receptor</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (del acrónimo en inglés, <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
UC	Cordón umbilical
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del acrónimo en inglés, <i>vascular endotelial growth factor</i>)

RESUMEN

La medicina regenerativa se basa en el uso de células troncales para fines terapéuticos, promoviendo la estimulación de los mecanismos de reparación propios del cuerpo para curar funcionalmente tejidos u órganos. Algunas de las aproximaciones recientes dentro del campo consisten en el uso de los productos de secreción de las células troncales; un conjunto de factores bioactivos con propiedades terapéuticas al que se le denomina secretoma o medio condicionado. Se ha demostrado que el efecto combinado de estos factores provoca una regulación de varios procesos celulares, entre ellos los de reparación tisular y angiogénesis. La psoriasis vulgaris es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter autoinmune y de origen multifactorial, caracterizada por provocar lesiones cutáneas distintivas en forma de placas gruesas, enrojecidas y escamosas, junto con un proceso angiogénico altamente desregulado. La primera línea de tratamiento de esta enfermedad corresponde a agentes tópicos, cuya aplicación resulta ser molesta para los pacientes y además genera efectos secundarios adversos como picazón, ardor, irritación, adelgazamiento y/o descoloración de la piel. Por lo anterior, en este seminario de título se decidió evaluar el efecto terapéutico del medio condicionado de células troncales mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton en lesiones psoriasiformes. Para ello se desarrolló una solución biotecnológica, combinando el secretoma de estas células en un biopolímero en base a ácido hialurónico (HA hWJCM), validando primeramente que este prototipo mantuviera las propiedades angiogénicas características del secretoma *in vivo*. A continuación, se evaluó el potencial terapéutico en un modelo murino con dermatitis psoriasiforme mediante diferentes protocolos de tratamiento, incluyendo el secretoma solo (hWJCM) o el polímero solo (HA Ctrl). Una vez finalizado los tratamientos, con el biopolímero activado se observó que, a diferencia

de ratones no tratados, con manifestaciones clásicas de la enfermedad e índice de severidad del área de psoriasis (PASI) alto, se logró una mejora significativa (76,47%) del índice PASI. Al visualizar la piel del lomo en las distintas condiciones experimentales, fue posible apreciar una reducción drástica del número de vasos totales con HA hWJCM respecto a individuos con dermatitis psoriasiforme, llegando a ser similares en cuanto al número y aspecto a la condición control (Ctrl). Un análisis histológico de la piel arrojó diferencias en el grosor de la epidermis, siendo esta de mayor espesor para los animales enfermos no tratados, concordante con lo reportado en la literatura. El grosor de la epidermis en las condiciones de hWJCM y HA hWJCM, en tanto, resultó ser menor, y más cercano a valor control.

Interesantemente, se encontró que, una vez iniciado el tratamiento de dermatitis psoriasiforme, los ratones a los cuales se les administró HA hWJCM, aumentaron de peso y al último día de tratamiento, estos individuos tuvieron una recuperación prácticamente total de su peso ($\Delta = -2,51\%$), seguido por los ratones tratados con hWJCM ($\Delta = -6,47\%$). Aquellos ratones tratados con HA Ctrl disminuyeron su peso hasta un nivel cercano al de los ratones enfermos ($\Delta = -9,84\%$ y $-12,11\%$ respectivamente), mientras que los ratones control mantuvieron su peso aproximadamente constante ($\Delta = -0,99\%$). Los resultados demuestran que el tratamiento tópico de la enfermedad con HA hWJCM reduce el índice PASI además de las molestias asociadas a la enfermedad y, por tanto, provoca un bienestar general en el animal, representando una solución terapéutica efectiva.

ABSTRACT

Regenerative medicine is based on the use of stem cells for therapeutic purposes, promoting the stimulation of the body's own repair mechanisms to functionally heal tissues or organs. Some of the recent approaches within the field consist of the use of stem cell secretion products; a set of bioactive factors with therapeutic properties which is called secretome or conditioned medium. The combined effect of these factors has been shown to cause regulation of various cellular processes, including tissue repair and angiogenesis. Psoriasis vulgaris is a chronic inflammatory disease of an autoimmune nature and of multifactorial origin, characterized by causing distinctive skin lesions in the form of thick, red, and scaly plaques, together with a highly dysregulated angiogenic process. The first line of treatment for this disease corresponds to topical agents, whose application is bothersome for patients and also generates adverse side effects such as itching, burning, irritation, thinning and/or discoloration of the skin. Therefore, in this title seminar it was decided to evaluate the therapeutic effect of the conditioned medium of mesenchymal stem cells derived from Wharton's gelatin in psoriasiform lesions. For this, a biotechnological solution was developed, combining the secretome of these cells in a biopolymer based on hyaluronic acid (HA hWJCM), first validating that this prototype maintained the angiogenic properties characteristic of the secretome *in vivo*.

Next, the therapeutic potential was evaluated in a murine model with psoriasiform like dermatitis using different treatment protocols, including secretome alone (hWJCM) or polymer alone (HA Ctrl). After completing the treatment with the active biopolymer, it was observed that, unlike untreated mice presenting classic manifestations of the disease and a high psoriasis area severity index (PASI), the treatment with HA hWJCM resulted in a significant improvement (76.47%) of PASI index. When visualizing the back skin of

the different experimental conditions, it was possible to see a drastic reduction in the number of total vessels with HA hWJCM compared to individuals with psoriasiform like dermatitis, being similar in terms of number and appearance to the control condition. A histological analysis of the skin showed differences in the thickness of the epidermis, being of greater thickness for untreated sick animals, consistent with that reported in the literature. In contrast, the epidermal thickness of hWJCM and HA hWJCM was found to be closer to the control condition.

Interestingly, once the treatment of psoriasiform like dermatitis started, mice administered with HA hWJCM gained weight and on the last day of treatment, these individuals had practically a total recovery of their body weight ($\Delta = -2.51\%$) followed by hWJCM treated mice ($\Delta = -6.47\%$). Those mice treated with HA Ctrl decreased their weight to a level close to that of diseased mice ($\Delta = -9.84\%$ and -12.11% respectively), while control mice kept their weight approximately constant ($\Delta = -0.99\%$). The results show that topical treatment of the disease with HA hWJCM reduces the PASI index in addition to the discomfort associated with the disease and, therefore, causes general well-being in the animal, representing an effective therapeutic solution.

INTRODUCCIÓN

Psoriasis

La psoriasis corresponde a una enfermedad inflamatoria crónica de carácter autoinmune que posee un origen multifactorial. Algunos desencadenantes pueden ser la predisposición genética de un individuo, traumatismos, estrés, infecciones y drogas entre otros. Esta patología se caracteriza por provocar lesiones eritemato-escamosas en la piel y afecta alrededor del 2 a 3% de la población mundial, pudiendo presentar variaciones según distintas regiones y etnicidades (Rendon & Schäkel 2019). Estas lesiones son generadas por un crecimiento exacerbado de queratinocitos, una desregulación del proceso angiogénico y un aumento de la infiltración de tipos celulares del sistema inmune como linfocitos T, células dendríticas y neutrófilos en la dermis y epidermis (Onderdijk & Hekking-Weijma, 2017). Existen varios tipos clínicos de psoriasis entre los cuales se encuentran: psoriasis vulgaris, psoriasis de cuero cabelludo, psoriasis pustular, psoriasis guttata, psoriasis en uñas, psoriasis eritrodérmica y psoriasis inversa, siendo la primera de ellas, la forma más común.

La psoriasis es catalogada como una enfermedad sistémica. Se le han asociado diversas comorbilidades, siendo las más comunes artritis psoriásica la cual puede llegar a afectar aproximadamente hasta a un 40% de los pacientes (Valenzuela y col., 2011; Rendon & Schäkel, 2019) y la enfermedad hepática grasa no alcohólica asociada al síndrome metabólico. Otras comorbilidades que se han asociado a la patología corresponden a diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Crohn, hipertensión y obesidad (Rendon & Schäkel, 2019; Armijo y col., 2020).

Asimismo, la psoriasis, al provocar dolorosas lesiones evidentes en diversas partes del cuerpo, genera un impacto en la calidad de vida de los pacientes. Sumado a lo anterior,

debido a la percepción de la imagen personal, los pacientes psoriásicos tienen problemas de autoestima e incluso pueden llegar a sufrir estigmatización por parte de la sociedad. Es muy probable que estos pacientes además padezcan depresión, ansiedad y tengan pensamientos suicidas. Sin embargo, se ha descrito que frente al tratamiento de la afección, existe una mejora en cuanto a los síntomas que se encuentran asociados a la ansiedad (Rendon & Schäkel, 2019).

Psoriasis Vulgaris

Corresponde alrededor del 80% - 90% de los casos de psoriasis (Rendon & Schäkel, 2019; Seetharaman y col., 2019). Este tipo de psoriasis, también se denomina psoriasis en placa por las demarcadas y gruesas placas eritemato-escamosas que genera en el cuerpo, las cuales tienen un diámetro mayor a 0,5 cm (Kim y col., 2017).

Fisiopatología de la psoriasis

Existe una predisposición genética en los queratinocitos que constituyen la epidermis, los cuales al ser estimulados secretan interleucina 1 beta (IL-1 β), interferón gama (IFN- γ) junto con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), citoquinas proinflamatorias que ejercen su acción al promover la activación de células dendríticas. También existe secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) junto con otros inductores de la angiogénesis por los queratinocitos previamente activados (Wagner y col., 2010; Armstrong y col., 2011), aunque también existe una contribución minoritaria en la producción de VEGF por parte de fibroblastos. Este factor de crecimiento se encuentra implicado en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis, ambos relacionados con la formación de vasos sanguíneos *de novo* y a partir de vasos preexistentes, respectivamente. VEGF en el contexto psoriásico promueve la vasodilatación además

de la permeabilidad de estructuras vasculares (Bhushan y col., 1999). Lo anterior contribuye a la migración de componentes del sistema inmune hacia la piel.

Por otro lado, también se produce un péptido antimicrobiano LL-37, el cual puede formar complejos con biomoléculas como ADN y ARN, para más tarde participar en la activación de células dendríticas plasmocitoides. Estas últimas, a su vez, producen citoquinas como IFN- α , IL-1, IL-2, IL-23 y TNF- α , que provocan la activación de células linfoides innatas y linfocitos $\gamma\delta$ además de desencadenar la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17, que también liberan factores claves (Novelli y col., 2014; Furue & Kadono, 2016; Clausen & Laman, 2017). Finalmente se genera un ciclo de inflamación que no puede ser controlado producto de las numerosas citoquinas circulantes, y por lo tanto se mantiene en el tiempo. Estos factores secretados por las células, promueven la hiperproliferación y diferenciación aberrante de queratinocitos, signo notorio a nivel de la histología de piel psoriásica, pudiendo apreciarse el fenómeno de acantosis que corresponde a un engrosamiento de la epidermis, paraqueratosis (retención del núcleo en células del estrato córneo) además de neovascularización (Baliwag y col., 2015; Rendon & Schäkel, 2019).

Por otra parte, se ha visto asociada a las lesiones psoriásicas, una alta expresión de angiopoyetinas (Ang) en comparación a la piel normal, siendo Ang-1 expresada por células mononucleares inflamatorias, células dendríticas y fibroblastos mientras que Ang-2 es expresada por células endoteliales. Lo anterior sugiere que Ang-1 y Ang-2, cuya actividad es mediada por el receptor Tie2, también tendrían un rol en el proceso angiogénico aberrante que ocurre en la patología dado que frente al tratamiento de la psoriasis, se ha observado una disminución de estos factores en la piel (Kuroda y col., 2001).

Tratamientos para pacientes psoriásicos

Para el tratamiento de la psoriasis existen distintas soluciones actualmente en el mercado y la elección adecuada, depende de una variedad de factores. Entre ellos se encuentra principalmente la severidad de la enfermedad, su evolución, la eficacia clínica del tratamiento, las comorbilidades del paciente, los efectos secundarios asociados, las preferencias del paciente y posibles alergias a medicamentos que pudiera sufrir este último (Gold, 2016; Mocanu y col., 2019). El tratamiento más común utilizado en primera instancia corresponde a la aplicación tópica local de corticoesteroides, derivados de vitamina D, derivados de retinoides y compuestos como antralina y tacrolimus entre otros, los cuales disminuyen la inflamación y regulan el proceso proliferativo de queratinocitos principalmente. Si bien los tratamientos tópicos mejoran la severidad de la enfermedad, la eficacia y potencia depende del tipo de vehículo utilizado en la administración. También es común que sea recetado el uso de más de un compuesto, lo que puede provocar que la aplicación se torne complicada o difícil para el paciente. Este tipo de tratamiento debe ser utilizado constantemente para apreciar cambios en la apariencia de la piel psoriásica por un periodo que puede llegar ser extenso, lo cual genera la impresión en el paciente que el tratamiento no es efectivo. Se ha visto que “la adherencia por parte del paciente al tratamiento es baja, puesto que pueden olvidarse de aplicar los compuestos, pueden encontrar el tratamiento molesto, pueden considerar las instrucciones para aplicar el medicamento largas y confusas o pueden llegar a aplicarse el medicamento solo cuando lo consideren necesario” - traducción propia, (Gold, 2016). Sumado a lo anterior, también se ha visto en algunos casos que pacientes han discontinuado el tratamiento por la consistencia y olor de este, por la irritación y dolor inicial que provoca y también por la satisfacción asociada a la eficacia y rapidez de los resultados obtenidos además de los efectos adversos asociados. Considerando

la problemática de adherencia al tratamiento tópico, una posible solución para ello sería reemplazar el uso de vehículos de naturaleza oleosa, que se encuentran presentes en la mayoría de las formulaciones tópicas, por un vehículo cosmetológicamente atractivo no irritante y que sea de fácil aplicación, lo cual podría lograrse con una matriz polimérica biocompatible.

Otros tipos de tratamientos que se encuentran enfocados hacia la psoriasis moderada a severa corresponden a la terapia sistémica tradicional, en la cual se utilizan fármacos, o fototerapia. Respecto al primer tipo, existen compuestos tales como metotrexato, ciclosporina y acitrecina que pueden ser administrados por vía oral o intravenosa. Sin embargo, éstos pueden llegar a provocar efectos adversos como lo son la formación de tumores, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, hipertensión e hipercalemia entre otras. Por otro lado, la fototerapia se basa principalmente en la acción de la radiación ultravioleta (UV) como resulta ser el caso de UVB, aunque también pueden estar asociados fármacos como lo es psoraleno en el caso del tratamiento PUVA, sin embargo, también se emplean otras fuentes de luz (Zhang & Wu, 2018), utilizándose también en lesiones cutáneas que son resistentes al tratamiento tópico. La fototerapia debe realizarse en centros clínicos especializados requiriendo de visitas frecuentes, lo que puede estorbar con las actividades cotidianas de los pacientes tornándose altamente inconveniente (Kim y col., 2017). Además se han asociado efectos secundarios adversos a su uso prolongado como lo son el trastorno de la pigmentación, el fotoenvejecimiento, cataratas e incluso diversos tipos de cáncer de piel, entre ellos melanoma, carcinoma escamocelular y carcinoma basocelular (Archier y col., 2012; Zhang & Wu, 2018).

En los últimos años se ha ido desarrollando una nueva categoría de tratamientos del tipo sistémico para la psoriasis que corresponde a tratamientos biológicos, en los cuales

se utilizan principalmente anticuerpos contra citoquinas específicas claves en el desarrollo y mantención de la patología, tales como IL-12, IL-17, IL-23 y TNF- α . Estos tratamientos han demostrado disminuir entre el 75 y 90% la severidad de psoriasis respecto a un estado basal y presentan una mayor adherencia por parte de los pacientes en comparación a los tratamientos del tipo sistémico tradicional y tópico (Furue & Kadono, 2016; Oliveira y col., 2019). Si bien los agentes biológicos son altamente eficientes, éstos deben ser administrados por un personal capacitado lo que significa, nuevamente asistir con frecuencia a un centro especializado. Por otro lado, el tratamiento con agentes biológicos, no se encuentra exento de provocar efectos adversos en los pacientes y además genera una limitante económica puesto que su costo al año oscila entre 20.000 y 25.000 USD (Oliveira y col., 2019).

Medicina regenerativa

La medicina regenerativa corresponde a un área que busca el desarrollo de nuevas terapias con el fin de promover la regeneración de células, tejidos enfermos y dañados al igual que órganos completos (Mao & Mooney, 2015). Esto se basa en recrear el nicho celular que se ve afectado, por medio del uso de biomateriales, células y compuestos bioactivos.

Células troncales

El uso de células troncales en la medicina regenerativa hoy en día es bastante común. Este término hace referencia a células indiferenciadas que cuentan con un alto potencial proliferativo y que poseen dos características fundamentales particulares: la primera es la capacidad de auto renovación, que permite originar poblaciones de células clonales, mientras que la segunda es la capacidad de originar células diferenciadas, es decir, células que poseen menor potencial proliferativo y cuentan con un mayor grado de

especialización para realizar determinadas funciones (Flores-Figueroa y col., 2006; Vizoso y col., 2017).

Las células troncales varían en cuanto a su potencialidad, dependiendo de los tipos celulares a los que pueden dar origen, pudiendo ser totipotenciales, pluripotenciales o multipotenciales. Además pueden ser clasificadas de acuerdo al estadio de desarrollo de un organismo pudiendo categorizarse como: adultas, embrionarias o fetales (Biehl & Russell, 2009; Marino y col., 2019). Se ha reportado que la administración de estas células provoca un efecto terapéutico, el cual se ha hipotetizado que puede ocurrir por tres fenómenos diferentes, siendo estos el “homing”, referido a la capacidad de migración que poseen éstas para localizar sitios donde exista algún tipo de lesión e interactuar con otras células. El segundo corresponde a diferenciación hacia determinados tipos celulares y el tercero a la capacidad de secretar factores bioactivos que actúan de manera paracrina (Vizoso y col., 2017).

Células troncales mesenquimáticas

Las células troncales mesenquimáticas (MSC) corresponden a una pequeña población de células progenitoras multipotentes presentes en una gran cantidad de tejidos (Amable y col., 2014). Inicialmente, estas células fueron identificadas en la médula ósea, obteniéndose mediante un proceso altamente invasivo, pero al día de hoy, han podido ser recolectadas a partir de distintos tejidos, tales como endometrio, músculo esquelético, tejido adiposo, cordón umbilical, pulpa dental, fluido amniótico, sangre fetal, hígado, pulmones, corazón y piel, entre otros (Ullah y col., 2015; Marino y col., 2019; Mastrolia y col., 2019).

De acuerdo al Comité de células madre mesenquimales y tisulares de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés), existen tres criterios

mínimos para definir MSC humanas. Estas células deben ser adherentes al plástico en condiciones estándar de cultivo, deben expresar los marcadores de superficie celular CD105, CD73 y CD90 y carecer de marcadores de superficie como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR. Asimismo, las células en cuestión deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro* (Dominici y col., 2006).

A pesar que las MSC provienen de distintos tejidos, estas comparten similitudes en cuanto a sus propiedades, lo que hace que sean ampliamente utilizadas en el área biomédica. Hasta enero del año 2021 existen 1.225 estudios clínicos que involucran el uso de MSC para la reparación de heridas y quemaduras, lesiones de médula espinal, además del tratamiento de enfermedades como: insuficiencia renal, insuficiencia hepática, nefropatía diabética, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, osteoartritis, urticaria y psoriasis entre otras (clinicaltrials.gov).

Se ha observado que al ser trasplantadas MSC al corazón o al torrente sanguíneo, estas células han sido capaces de localizar tejidos dañados que poseen vasos sanguíneos rotos o inflamados, promover la regeneración de éstos y restaurar la función de tipos celulares. Por lo anterior, dichas células han sido también utilizadas para tratar numerosas enfermedades que involucran estas características (Caplan & Correa, 2011; Vizoso y col., 2017). Inicialmente se asoció la reparación y regeneración de tejidos de estas células a su “troncalidad”, en otras palabras, a la capacidad de diferenciación que éstas poseen. Sin embargo, posteriormente fue reportado que el efecto terapéutico ocurría en un periodo muy breve para ser atribuido a la diferenciación *in situ* de las células implantadas hacia el tipo celular de interés (Gnecchi y col., 2005). A su vez, se ha descrito que el porcentaje de supervivencia de estas células luego de haber sido

implantadas es ínfimo (Gnecchi y col., 2008; Vizoso y col., 2017). Lo anterior provocó que se formulara una nueva hipótesis, en la cual se atribuye el efecto terapéutico de MSC a los compuestos que estas secretan (Gnecchi y col., 2008), lo cual se asocia al concepto de estromalidad. Este se refiere a la producción de componentes bioactivos tanto solubles (como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos libres) como no solubles (tales como vesículas extracelulares). Entre la fracción no soluble, es posible encontrar cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (Vizoso y col., 2017). Los exosomas corresponden a vesículas secretadas a partir de un proceso de remodelación de membrana, que pueden tener entre 30 y 150 nm de diámetro (Gupta y col., 2020) y cuentan con una composición determinada dependiendo de la célula que los origina. Los exosomas son un modo de comunicación intercelular de gran importancia pues actúan de manera paracrina transfiriendo proteínas y material genético como micro ARNs, finalmente regulando distintos procesos fisiológicos de las células vecinas por medio de diversas vías de señalización (Teixeira & Salgado, 2020).

Como los compuestos bioactivos secretados por MSC poseen propiedades terapéuticas, se ha denominado a estas células como *Medicinal Signaling Cells* (Caplan, 2010). Por lo anterior, estas células han llegado a ser comparadas con drogas. Sin embargo, las MSC corresponden a entidades vivientes y por lo tanto presentan un metabolismo, además de receptores y la capacidad de responder frente a determinados estímulos, los cuales pueden llegar a modificar tanto las propiedades funcionales como los efectos terapéuticos de estas en un determinado contexto patológico (Mastrolia y col., 2019). Se ha visto que los compuestos bioactivos producidos por las MSC pueden llegar a reducir la inflamación y acelerar el proceso regenerativo (Amable y col., 2014),

aunque también se ha demostrado un efecto inmunomodulador y la capacidad de regular el proceso angiogénico. Sin embargo, se debe considerar que generalmente el número de células obtenido a partir de un cultivo primario es inferior a las cantidades que son requeridas para los tratamientos de patologías, por lo que para contar con la cantidad necesaria para una dosis, estas deben ser expandidas realizando numerosos subcultivos o cultivadas dentro de un biorreactor (Mastrolia y col., 2019).

Cabe destacar que las propiedades asociadas a la estromalidad de MSC, dependen tanto de las condiciones del donante como del tejido del cual provienen las células, por lo cual la elección adecuada de MSC es relevante al momento de realizar una terapia (Caplan & Correa, 2011; Amable y col., 2014).

Al conjunto de factores bioactivos liberados al medio extracelular por MSC, se le denomina secretoma o medio condicionado (CM) (Cunningham y col., 2018). Dichos factores pueden actuar de manera autocrina o paracrina sobre MSC, células endoteliales y epiteliales, entre otras (Gupta y col., 2020).

Hoy en día se buscan terapias que promuevan la reparación y regeneración de tejidos sin el uso de células. El uso del secretoma respecto a la administración de MSC presenta numerosas ventajas, entre ellas se evita la potencial tumorigenicidad, la obtención resulta ser más rápida y además el cultivo celular del cual se obtiene podría ser estimulado para potenciar sus efectos curativos frente a una determinada enfermedad (Vizoso y col., 2017; Teixeira & Salgado, 2020). Por todo lo anterior es que hoy en día el desarrollo de nuevos tratamientos está siendo enfocado al uso del secretoma en vez de las mismas MSC, puesto que el secretoma ha sido igualmente de efectivo que la administración de MSC en diversas patologías (Vizoso y col., 2017).

Actualmente existen 16 ensayos clínicos que comprenden el uso de MSC CM (clinicaltrials.gov).

Células troncales mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton

La gelatina de Wharton corresponde a un tejido conectivo rico en colágeno, ácido hialurónico y proteoglicanos sulfatados en el cual se encuentran inmersas las estructuras vasculares del cordón umbilical, teniendo como función principal entregar amortiguación, protección y soporte a éstos (Gupta y col., 2020). Esta sustancia gelatinosa además contiene MSC en su interior denominadas hWJ MSC. Estas células son jóvenes, de morfología fibroblastoide, presentan baja inmunogenicidad y además, no cuentan con potencial teratogénico (Marino y col., 2019). Las hWJ MSC han demostrado contar con una mayor capacidad proliferativa, esperanza de vida y potencial de diferenciación respecto a otros tipos de células troncales como lo son derivadas de la médula ósea (BM MSC) y grasa (AD MSC) (Mastrolia y col., 2019), puesto que la capacidad de expansión de estas células disminuye con la edad.

Medio condicionado - Secretoma de células hWJ MSC

Estudios previos, incluyendo realizados en el laboratorio de la Dra. Palma, han demostrado que existe una expresión en hWJCM de factores asociados a reparación de heridas y al proceso de angiogénesis. Algunos de ellos son: factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), VEGF, angiogenina, angiopoyetinas, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), IL-1 β , IL-8, factor de crecimiento epidérmico (EGF), angiostatina, endostatina, vaso inhibina, trombospondinas y serpinas entre otros (Amable y col., 2014; Edwards y col., 2014; Carrillo y col., datos no publicados). Por otro lado, ha sido descrito que las vesículas

extracelulares presentes en hWJCM, tienen un efecto sobre la proliferación, viabilidad celular y también presentan la capacidad de inmunomodulación (Gupta y col., 2020).

Uso de MSC en psoriasis

Como se mencionó previamente, los beneficios clínicos relacionados a MSC se deben a la administración de estas o por los efectos que provocan debido a la secreción de factores bioactivos. Se ha descrito que la infusión de MSC de cordón umbilical (UC MSC) en ratones con dermatitis psoriasiforme (DP), provoca la disminución de citoquinas proinflamatorias tales como IL-17, IL-23, IFN- γ y por el contrario, genera un aumento en la expresión de IL-10, una citoquina con propiedades antiinflamatorias (Chen y col., 2019).

También ha sido reportado que la infusión de UC MSC en dos pacientes con psoriasis vulgaris, evitó la reaparición de la enfermedad durante 4 y 5 años, respectivamente (Chen y col., 2016). Sin embargo, dado que los beneficios de la administración MSC se han atribuido a los factores secretados por estas, el año 2019 se realizó el primer reporte de caso de tratamiento de psoriasis con los factores biológicos liberados por MSC. En el caso de estudio, un paciente masculino de 38 años de edad quien sufría de lesiones psoriásicas severas en el cuero cabelludo, fue tratado con medio condicionado de AD MSC (AD MSC CM) de manera tópica durante un mes. Una vez que el tratamiento llegó a su fin, se alcanzó la regresión total, demostrando que AD MSC CM efectivamente mejora la apariencia de las lesiones características de la patología (Seetharaman y col., 2019).

Escala PASI

Una manera de medir la efectividad de un tratamiento mediante el grado de severidad de psoriasis, corresponde a la disminución del Índice de Severidad del Área de Psoriasis

(PASI, por sus siglas en inglés). Este índice se basa en el porcentaje de área del cuerpo cubierta por las lesiones psoriásicas y el aspecto de estas. El índice PASI considera tres características: eritema, descamación y engrosamiento, asociadas a un puntaje que oscila desde 0 hasta 4, donde: 0 corresponde a nula presencia de tal característica y 4 a un nivel extremadamente severo de dicha característica (Feldman & Krueger, 2005). Sumado a lo anterior, existe un porcentaje determinado para las distintas zonas del cuerpo afectadas por dichas lesiones, siendo estas: cabeza, extremidades superiores, torso y extremidades inferiores las cuales corresponden al 10, 20, 30 y 40% del área total del cuerpo. Por otra parte, se encuentra el área de compromiso psoriásico que tiene asociado un valor numérico que va desde 0 hasta 6, dependiendo del porcentaje que afecta a la región analizada de acuerdo a lo siguiente “0= sin implicancia, 1= < 10%, 2= 10 < 30% , 3= 30 < 50% , 4= 50 < 70%, 5= 70 < 90% y 6= 90-100%” (Fredriksson & Pettersson, 1978).

Para calcular el índice PASI, finalmente se requiere sumar el valor de severidad correspondiente a las 3 características de las lesiones, multiplicarlo por el porcentaje asociado a cada zona del cuerpo y por el valor asignado al porcentaje de área total de la porción del cuerpo analizada cubierta con dichas lesiones, obteniéndose el resultado final que puede variar entre 0 y 72. Es posible conocer la severidad de la enfermedad según el puntaje total obtenido de acuerdo a lo siguiente: PASI < 7 se considera leve, 7 < PASI < 12 como moderada y finalmente 12 < PASI es considerada severa (Schmitt & Wozel, 2005).

Dermatitis psoriasiforme

Un modelo para el estudio de psoriasis *in vivo*, corresponde a la inducción de dermatitis psoriasiforme en un modelo murino, por medio de la aplicación tópica constante de

Imiquimod (IMQ), un compuesto utilizado principalmente para tratar verrugas genitales y perianales, originadas por el virus del papiloma humano, y otras afecciones como la queratosis actínica y carcinoma basocelular. IMQ es un ligando de receptores tipo toll 7/8 (TLR7/8) y un potente activador de la respuesta inmune (Ueyama y col., 2014). La dermatitis psoriasiforme desencadenada por IMQ en ratones, presenta similitudes con las lesiones psoriásicas humanas en cuanto a características fenotípicas e histológicas como: la presencia de escamas, eritema, alteración en la epidermis atribuido a los fenómenos de acantosis, paraqueratosis y la ausencia del estrato granular, además de neoangiogénesis e infiltrado celular por parte de linfocitos, neutrófilos y células dendríticas (van der Fits y col., 2009). Debido a lo anterior, ha sido creada una escala PASI modificada para ratones, la cual se muestra en la figura 1.

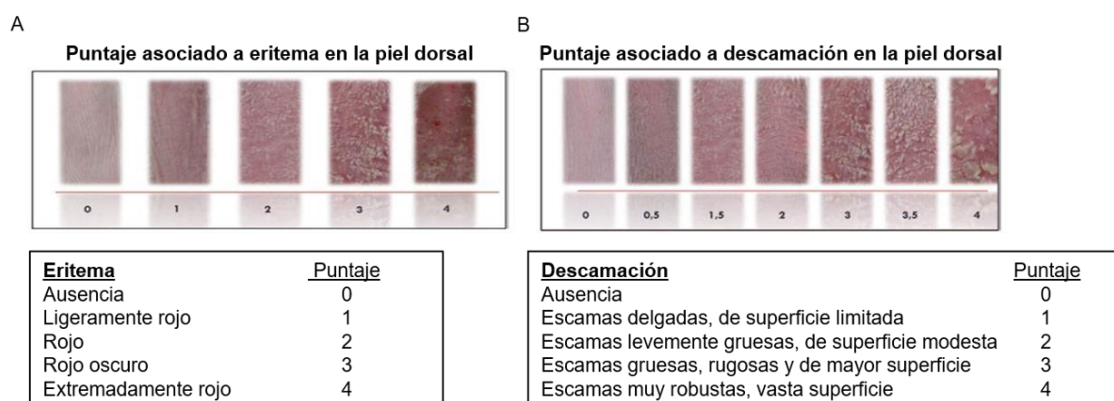


Figura 1. Escala PASI modificada. Se muestra el puntaje clínico asociado al nivel de eritema (**A**) y descamación (**B**) en dermatitis psoriasiforme en un modelo murino (traducción propia de Clausen & Laman, 2017).

A diferencia de la escala PASI en humanos, la versión murina no considera el área de una determinada zona del cuerpo, puesto que siempre se evalúa una misma región que suele ser el lomo del animal, aunque también se puede evaluar la oreja (van der Fits y

col., 2009; Na Takuathung y col., 2018). Por otro lado, el grosor de la piel es determinado utilizando un instrumento de medición llamado caliper.

Uso de biopolímeros en la medicina regenerativa

Como parte de la medicina regenerativa, se han desarrollado matrices en base a biopolímeros para reforzar, reemplazar, entregar soporte a órganos y reparar tejidos. Algunas de las matrices sintetizadas, se han caracterizado por presentar una estructura altamente porosa, lo cual permite que puedan ser suplementadas con células. Sin embargo, continúa siendo un desafío la supervivencia y la proliferación de éstas *in vivo* por lo que la búsqueda y caracterización de biomateriales sigue siendo necesaria.

Algo que resulta ser sumamente importante al momento de utilizar polímeros en sistemas biológicos, es que no provoquen citotoxicidad ni reacciones adversas y que además presenten propiedades de bioestabilidad y biodegradabilidad (Francis, 2018).

El uso de biopolímeros, también ha sido empleado para producir sistemas de liberación de drogas y/o fármacos (Soria y col., 2008). Se entiende a este último como “una formulación o un dispositivo que permite el transporte de un agente terapéutico en el cuerpo por medio del control de velocidad, tiempo, lugar y liberación de los medicamentos al sitio de interés” – traducción propia (Gopi y col., 2018), sin requerir del uso de células. Respecto a esto, se ha empleado el uso del ácido hialurónico (HA) tanto en parches con micro agujas (Du y col., 2019) como esponjas, ambos con posibles aplicaciones biomédicas para el transporte de fármacos. Las esponjas de HA han logrado ser obtenidas a partir de un proceso de liofilización, el cual consiste en la remoción de agua a partir de una muestra congelada, lo cual permite una mejor manipulación del producto final al poseer una alta estabilidad, entregando además la facilidad de ser almacenado y transportado (Villamizar-Sarmiento y col., 2019).

Ácido hialurónico

El HA es un biopolímero catalogado como glicosaminoglicano, conformado por unidades repetitivas de n-acetilglucosamina y ácido glucurónico. El HA se encuentra distribuido ampliamente en el organismo encontrándose en distintos tejidos, incluyendo cordón umbilical y concentrándose mayormente en la matriz extracelular (MEC) y fluidos corporales (Cooper y col., 2008; Masuko y col., 2009). Este compuesto ha sido utilizado en tratamientos debido a su gran capacidad de retención de agua y por no generar una respuesta inmune (Du y col., 2019).

Las propiedades del HA dependen del grado de polimerización que este tenga, pues se ha visto que HA de alto peso molecular posee propiedades antiinflamatorias mientras que al de bajo peso molecular se le han asociado propiedades proinflamatorias (Cooper y col., 2008). Se ha reportado que HA de alto peso molecular provoca un microambiente celular particular al mantenerlo altamente hidratado, entregar protección mecánica y regular el balance osmótico (Pardue y col., 2008). Sumado a la capacidad de modular la inflamación aguda y crónica *in vivo*, HA puede reducir la actividad nociceptora, aminorar edema e infiltración de neutrófilos. HA ejerce su acción al unirse al receptor de superficie CD44, presente tanto en leucocitos como en células endoteliales, disminuyendo la migración de leucocitos hacia sitios de lesión o inflamación y también reduciendo la permeabilidad vascular (Cooper y col., 2008). También se ha visto que HA en un sitio de lesión bloquea a factores iniciantes de la respuesta inflamatoria como lo son IL-1, IL-6 y TNF- α al igual que fosfolipasa A-2 (PLA-2), una enzima que se encuentra relacionada con la modificación de lípidos de membrana para generar un precursor de las prostaglandinas, moléculas implicadas en la homeostasis pero que, al aumentar, tienen un rol inflamatorio y estimulan terminales nerviosos de dolor. Cabe

destacar que en la regulación de esta vía, no se han observado efectos adversos producto de la administración de HA (Cooper y col., 2008).

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, queda en evidencia el atractivo que podría presentar la bioactivación de biopolímeros mediante la combinación *in vitro* con hWJCM, rico en factores tróficos que fomenten la reparación de tejidos y angiogénesis funcional en dermatitis psoriasisiforme.

El presente seminario de título tiene por objetivo analizar el potencial terapéutico de un biopolímero activado de HA con secretoma de hWJ MSC, enfocándose en su potencial promotor de la regulación angiogénica y reparación dermal en un modelo preclínico.

Hipótesis

El medio condicionado de células provenientes de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano liofilizado en combinación con ácido hialurónico como soporte polimérico, disminuye las manifestaciones clínicas de dermatitis psoriasisiforme en un modelo murino.

Objetivo general

Evaluar las capacidades antiinflamatorias y reguladoras del proceso angiogénico de un polímero bioactivado (HA hWJCM), en un modelo murino de dermatitis psoriasisiforme.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células hWJ MSC

Se utilizaron 3 cordones umbilicales provenientes de pacientes facilitados por el Hospital Dr. Luis Tisné Brousse (Santiago, Chile) con un previo acuerdo de consentimiento por parte de las madres donantes sanas. Dichas muestras fueron utilizadas solo con el fin expuesto en este seminario de título, que contó con la aprobación de Comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y con la aprobación del Comité asesor de bioética del Hospital, en el marco del desarrollo de la tesis doctoral en biotecnología de la Dra. Daniela Carrillo. Los cordones fueron procesados y las células de éstos aisladas mediante el protocolo estándar implementado en el laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo (CT&BD) de la Universidad de Chile, el cual se encuentra protegido por secreto industrial.

Subcultivos de hWJ MSC

Para obtener subcultivos a partir de los cultivos primarios, fue necesario asegurarse de que existiera un alto porcentaje de confluencia en éstos. Una vez comprobado lo anterior, las células fueron lavadas y se realizó el pasaje de ellas de acuerdo al protocolo del laboratorio CT&BD.

Análisis de expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo

Los cultivos primarios obtenidos, fueron analizados, mediante citometría de flujo (Colaboración con la Dra. Daniela Sauma, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) en un equipo FACSCanto II (BD Biosciences) con software FACSDiva Version 6.1.3 (BD Biosciences). La finalidad de la citometría de flujo fue evaluar la expresión de los marcadores de superficie correspondientes a MSC como lo son CD105, CD90 y CD73 y la ausencia de marcadores hematopoyéticos tales como CD45 y CD34.

Obtención de hWJCM

Se sembraron aproximadamente 170.000 células por placa de Petri de 60 mm, a las cuales se les suministró medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina-estreptomicina (P/S) hasta alcanzar confluencia de un 80-90%. Luego, se cambió el medio de cultivo, esta vez utilizando DMEM sin rojo fenol (SRF) privado de SFB. El medio condicionado fue colectado luego de 48 horas y almacenado a -80°C hasta su uso.

Síntesis de esponjas

Luego de la liofilización de dos soluciones acuosas, se obtuvieron como productos finales esponjas correspondientes a los tratamientos de HA Ctrl y HA hWJCM (trabajo realizado en colaboración con el Dr. Felipe Oyarzún, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile, protocolo sujeto a patentamiento). En el primer caso la solución estuvo compuesta por agua ultra pura y por HA de alto peso molecular mientras que en el segundo caso además se agregó hWJCM.

Ensayo CAM para evaluar angiogénesis *in vivo*

Se adquirieron huevos fertilizados de *Gallus gallus* de un proveedor local (Avícola Chorombo, Pirque) y se mantuvieron a 18°C en una cava de vino (General Electric, EE.UU) por un día. Al día siguiente, los huevos fueron limpiados con etanol al 70%. Más tarde se colocaron a 37°C en una incubadora (G.Q.F. MFG. Co., EE.UU) con 50-60% de humedad. Al segundo día de desarrollo embrionario (E2), se realizó un pequeño agujero en el extremo más redondeado de cada huevo y se extrajeron 3 mL de albúmina. Al cuarto día de desarrollo embrionario (E4), se procedió a cortar una abertura en cada huevo, con el fin de reconocer la existencia o no de un embrión viable, caracterizado por la presencia de un corazón palpitante y la formación de vasos sanguíneos.

Transcurridos 4 días a partir de la apertura de ventana, en el octavo día de desarrollo embrionario (E8), los estímulos correspondientes a cada condición fueron colocados en la CAM, procurando que éstos quedaran entre la bifurcación de 2 vasos sanguíneos. Los estímulos considerados fueron los siguientes: HA hWJCM, HA Ctrl, DMEM SRF (Gibco, EE.UU; control negativo), VEGF (50 ng/mL; control positivo) y hWJCM. Para estas últimas soluciones, se colocaron 20 μ L de estímulo sobre la CAM. Finalmente, sobre todos los estímulos se colocó un cubreobjetos de vidrio de 12 mm diámetro (Thermofisher, EE.UU). Los resultados del potencial angiogénico de los estímulos fueron evaluados el día 12 de desarrollo embrionario (E12) mediante fotografías del área de la CAM sobre la cual se depositó el estímulo junto con el cubreobjetos. Para mejorar la visualización y contraste de los vasos sanguíneos, 3 mL de una mezcla 1:1 compuesta de crema de leche (Soprole, Chile) y agua bidestilada (Sanderson, Chile) fueron agregados bajo la CAM por medio de una inyección. Las imágenes fueron obtenidas utilizando una magnificación de 1X y una cámara digital HD IC80 (Leica, Alemania). A partir de las imágenes resultantes de los distintos estímulos sobre la CAM, se procedió a utilizar el programa ImageJ con el fin de cuantificar el número de vasos totales que se acercaron al estímulo interceptando los bordes del cubreobjetos y medir el diámetro de éstos. Los resultados de la cuantificación fueron normalizados en base al número de vasos en E8 correspondiente al estado basal. Lo anterior se muestra en la figura 2.

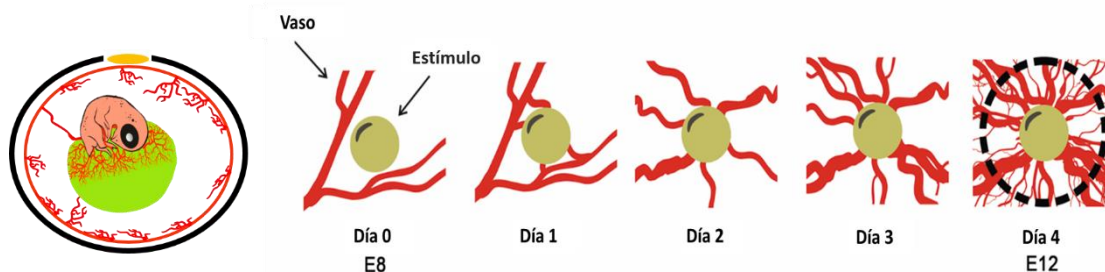


Figura 2. Esquema explicativo de ensayo CAM *in vivo*. Se muestra la metodología utilizada al momento de realizar la estimulación de CAM durante cuatro días, desde el estado de desarrollo embrionario 8 (E8) hasta el estado de desarrollo embrionario 12 (E12).

Inducción del modelo murino de dermatitis psoriasiforme

Se utilizaron 15 ratones hembras BALB/c de alrededor de 8-12 semanas de edad mantenidas en condiciones libres de patógenos específicos, con la temperatura y humedad relativa controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 45% respectivamente), un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, además de agua y comida *ad libitum*. El uso de estos ratones contó con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile. Inicialmente los ratones fueron anestesiados con isoflurano Forene (Abbvie, EE.UU) y depilados cuidadosamente con una rasuradora eléctrica y posteriormente con crema eliminadora de vellos (Veet, EE.UU). Luego se formaron 5 grupos experimentales correspondientes a Ctrl, DP, hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM. Se procedió a aplicar 62,5 mg de IMQ comercialmente disponible (Labimiq Crema Tópica 5 %, ITF-Labomed), correspondiente a una dosis de 3,125 mg diaria de IMQ, durante 12 días de acuerdo a la adaptación de un protocolo validado (van der Fits y col., 2009) en todos los grupos a excepción de la condición Ctrl.

Diseño experimental del tratamiento de la dermatitis psoriasiforme

A partir del cuarto día de la aplicación de IMQ, se iniciaron los distintos tratamientos, siendo HA hWJCM y HA Ctrl a nivel tópico. Para ello se humedecieron levemente 5

puntos de la piel dorsal de los animales sobre los cuales luego se colocaron las esponjas. Por otra parte, la administración de hWJCM fue realizada por medio de una dosis de 100 μ L por vía subcutánea, distribuida también en 5 puntos de la piel dorsal. Luego del transcurso de 4 horas desde la aplicación de los tratamientos, se continuó con la aplicación tópica de IMQ tal como se describió anteriormente. El tratamiento farmacológico tuvo una duración total de 9 días, completándose el protocolo experimental total al día 12.

Evaluación del efecto terapéutico de los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM mediante índice PASI, índice esplénico, índice hepático y examinación de la piel

Durante la inducción de DP se evaluó el peso de los ratones junto con el índice PASI, para lo cual se usó la escala modificada para un modelo murino y el grosor de piel fue medido utilizando un caliper. Los registros fueron hechos a los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11 de la inducción de la enfermedad, previo a la administración del correspondiente tratamiento. Para establecer el puntaje asociado al engrosamiento de la piel de acuerdo al índice PASI, se hizo una escala de conversión considerando: el promedio de grosor de piel de los ratones al primer día previo inducción de DP y el promedio de grosor de la piel psoriasiforme al día 11 para luego generar intervalos y obtener la puntuación correspondiente.

Una vez transcurridos los 12 días de la inducción de DP, luego de 24 horas, los ratones fueron eutanasiados de acuerdo a protocolo ético del laboratorio CT&BD de la Universidad de Chile y autorizado por comité CICUA local, por medio de sobredosis de isofluorano. El peso corporal fue registrado para cada ratón y además el bazo e hígado de cada individuo fueron extirpados y los correspondientes pesos de éstos registrados,

para evaluar índice esplénico e índice hepático como la razón entre el peso del órgano en cuestión y el peso total corporal. También, un trozo de piel de 4 cm² fue removido del dorso de los animales para observar en detalle la distribución de los vasos sanguíneos dermales. Dicho trozo de piel fue fotografiado bajo lupa con magnificaciones de 0,8X, 1,6X y 4X. A partir de las imágenes obtenidas con el aumento de 1,6X, se realizó la cuantificación de los vasos sanguíneos para lo cual se seleccionaron las ramificaciones más pequeñas (procurando no considerar vasos sanguíneos principales) y la medición del diámetro de éstos tal como fue descrito previamente. Además de lo anterior, se calculó: el número total de vasos sanguíneos nuevos de apariencia tortuosa, el índice de tortuosidad (IT) de éstos (Virgilio y col.,2017), considerando la razón entre la longitud de la curvatura del vaso sanguíneo (C) y la distancia más corta entre los puntos de inicio y fin de éste, dado por una línea recta (R), de acuerdo a:

$$IT = \left[\left(\frac{C}{R} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

También se evaluó la complejidad de la tortuosidad de los vasos sanguíneos, dado por el número de segmentos (NS) que éstos presentaban, según el criterio topológico de una red en árbol (Uytings & van Pelt, 2002) que se muestra en la figura 3, como:

$$NS = \sum_{i=1}^n S_i \quad (2)$$

Una vez obtenidas las fotografías de la piel dorsal de cada individuo, se cortó una pequeña muestra de piel de los individuos de cada condición experimental para generar cortes histológicos de 10 µm de espesor. Tras la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de las muestras extraídas, se procedió a fotografiarlas con un microscopio de fluorescencia BX51 (OLYMPUS, EE. UU) equipado con una cámara digital Moticam

2500, con magnificación 10X para apreciar los posibles cambios inducidos debido a los tratamientos. El resumen del protocolo experimental utilizado se muestra en la figura 4.

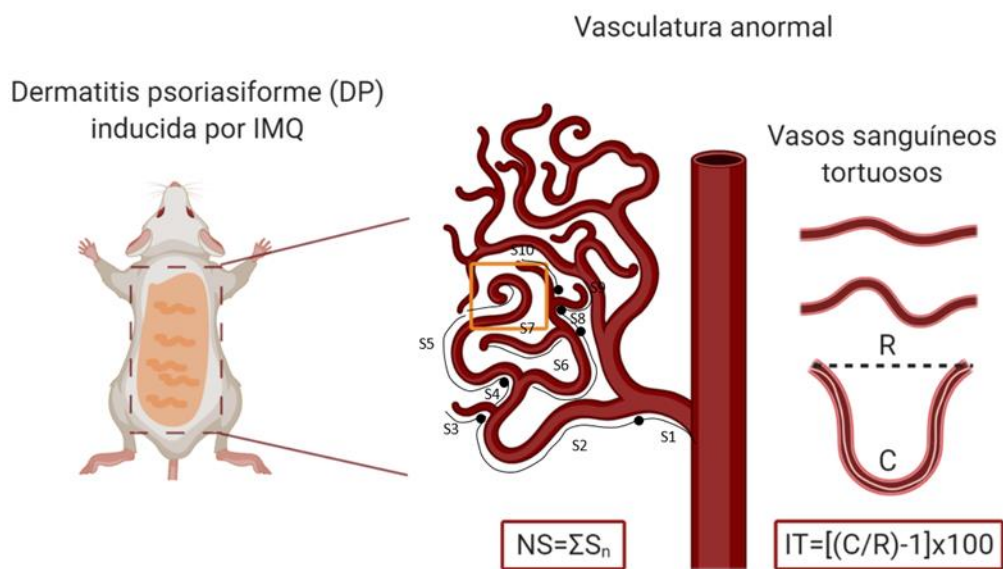


Figura 3. Criterio utilizado para la cuantificación de vasos sanguíneos tortuosos. La piel dorsal murina fue extirpada de cada individuo correspondiente a las distintas condiciones experimentales. Los ratones inducidos con DP mostraron vasculatura anormal caracterizada por vasos sanguíneos tortuosos. La vasculatura anormal se consideró como una arquitectura de vasos sanguíneos torcidos o doblados. Con el fin de evaluar la complejidad tortuosa de las estructuras mencionadas, se registró el número de segmentos totales para llegar a ellas. Por ejemplo, en el esquema se resalta un vaso sanguíneo torcido y el número de segmentos para ese vaso, que corresponde a 10. El índice de tortuosidad se utilizó para la cuantificación de la tortuosidad de un determinado vaso sanguíneo. Creado con Biorender.com.



Figura 4. Protocolo experimental. Se indica el procedimiento realizado para la inducción de DP y su respectivo tratamiento junto con los parámetros de interés que fueron evaluados. Creado con BioRender.com.

Cuantificación del grosor epidérmico

El grosor de la epidermis fue medido en el programa ImageJ. Esto fue realizado para un total de 15 imágenes, obtenidas tras fotografiar distintos cortes de piel teñidos con H&E, por cada condición experimental. La medición se realizó considerando la distancia entre el estrato basal y la capa más distal del estrato córneo.

Inmunohistoquímica

Se llevó a cabo la inmunotinción contra CD31, un marcador de células endoteliales, en los cortes histológicos obtenidos para analizar la estructura de la vasculatura dorsal en las distintas condiciones estudiadas. La inmunohistoquímica se realizó mediante el uso de una dilución 1:100 del anticuerpo policlonal CD31 (Invitrogen, EE.UU). Una vez detectada la marca para CD31, se tomaron fotografías con una magnificación de 20X utilizando el microscopio de fluorescencia BX51 (OLYMPUS, EE.UU) equipado con una cámara digital Moticam 2500.

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron representados como el promedio \pm desviación estándar. La diferencia estadística entre dos grupos experimentales fue analizada por medio de una prueba de Mann-Whitney y, por otro lado, aquellas diferencias entre grupos por medio de ANOVA de una vía seguido de múltiples comparaciones y Kolmogorov-Smirnov. Los gráficos y análisis estadísticos fueron efectuados con el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias entre grupos fueron consideradas como no significativas cuando $P \geq 0,05$ (ns), significativas cuando $P < 0,05$ (*), muy significativas cuando $P < 0,01$ (**), y extremadamente significativas cuando $P < 0,001$ (***) y $P < 0,0001$ (****).

RESULTADOS

Las células derivadas de la gelatina de Wharton expresan marcadores específicos de MSC

Con el fin de corroborar el fenotipo de MSC de las células aisladas de distintos cordones umbilicales, que presentaron morfología fibroblastoide y además demostraron ser adherentes al plástico, se realizó una citometría de flujo para evaluar la expresión de marcadores típicos de MSC de los cultivos establecidos.

Los resultados obtenidos de la citometría de flujo se muestran en la figura 5. Éstos indicaron la presencia de los marcadores CD105, CD90 y CD73. Por el contrario, indicaron la ausencia de los marcadores CD45 y CD34, tal como ha sido descrito previamente en la literatura.

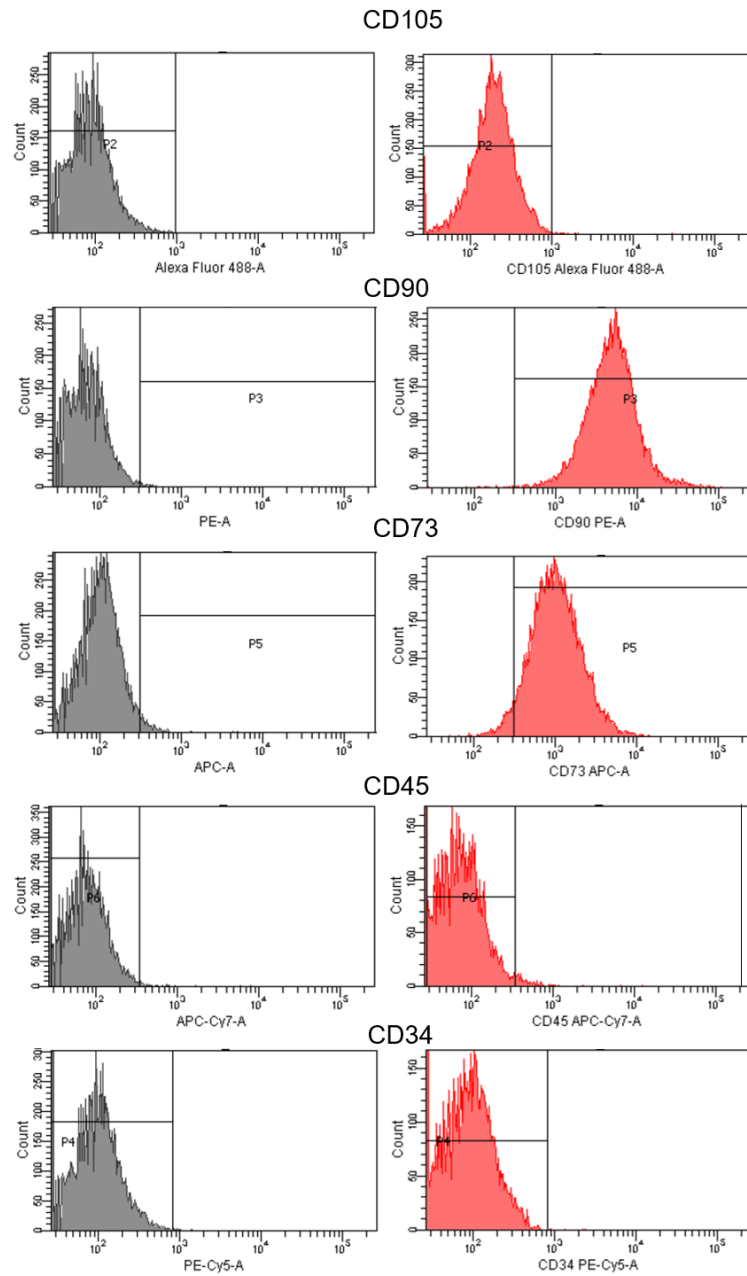


Figura 5. Las hWJ MSC expresan los marcadores CD105, CD90 y CD73 en ausencia de CD45 y CD34.

Se muestran los histogramas resultantes de la citometría de flujo de una muestra representativa de hWJ MSC. En gris se tiene la señal correspondiente a control sin anticuerpos, mientras que en rojo se observa la señal obtenida para la expresión de marcadores fluorescentes unidos a anticuerpos para los marcadores de superficie celular CD105, CD90, CD73, CD45 y CD34 en la muestra utilizada.

El tratamiento HA hWJCM presenta potencial angiogénico en un modelo CAM *in vivo*

Se realizó una evaluación del potencial angiogénico de HA hWJCM, (el soporte polimérico bioactivado se muestra en la Figura 6A), para conocer si dicha propiedad era mantenida tras el proceso de liofilización de hWJCM.

Luego de 4 días de estimulación de la CAM, fue posible observar un incremento de vasos sanguíneos en las condiciones HA Ctrl, VEGF, hWJCM y HA hWJCM respecto a la condición control DMEM SRF tal como se observa en las figuras 6B-F. Los resultados obtenidos tras la cuantificación, mostrados en la figura 6G, evidencian diferencias extremadamente significativas entre las membranas estimuladas con DMEM SRF y aquellas con hWJCM y HA hWJCM ($P < 0,001$). En estas condiciones se obtuvo un número de vasos totales similar a la del control positivo VEGF ($P < 0,0001$), lo que sugiere un fuerte potencial angiogénico por parte de estos estímulos. Si bien HA Ctrl presenta un mayor número de vasos sanguíneos respecto a DMEM SRF, no se evidenciaron diferencias significativas entre las mencionadas condiciones. En adición a lo anterior, en la figura 6H se observa que los vasos estimulados con VEGF, hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM resultaron tener un diámetro mayor en comparación a la condición DMEM SRF ($P < 0,0001$), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre esos estímulos ($P > 0,05$).

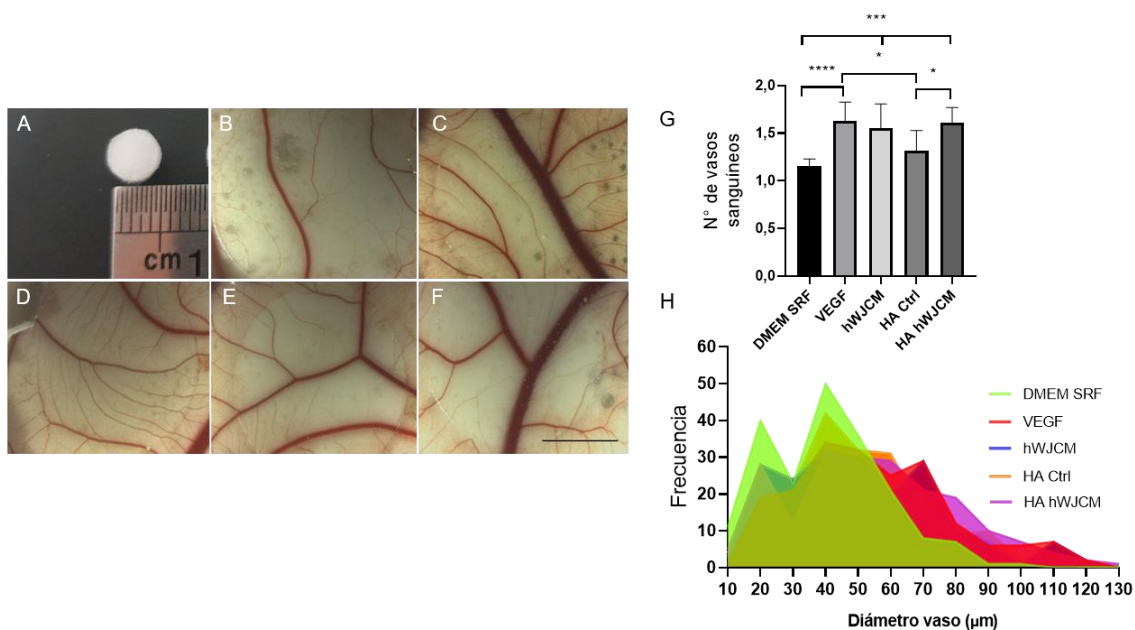


Figura 6. Las propiedades angiogénicas de hWJCM se mantienen luego del proceso de liofilización.

Se aprecia en (A) una esponja HA hWJCM, como producto final del proceso de liofilización. Se muestran las imágenes representativas obtenidas en distintas CAM de embriones de pollo al día número 12 de desarrollo embrionario (E12), luego de 4 días de estimulación con DMEM SRF (B), VEGF (C), hWJCM (D), HA Ctrl (E) y HA hWJCM (F), barra = 5 mm. En (G) se muestra la cuantificación de los vasos sanguíneos obtenidos para cada estímulo, resultado que se encuentra normalizado por el número total de vasos presentes en E8. Análisis estadístico ANOVA de una vía con múltiples comparaciones, $n=10$, $P < 0,05$. En (H) se observa la medición del diámetro de los vasos sanguíneos circundantes a los estímulos. Se encontraron diferencias extremadamente significativas entre DMEM SRF versus VEGF, hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM (****). Test Kolmogorov-Smirnov, $n=200$, $P < 0,0001$.

Evaluación del potencial terapéutico de hWJCM y HA hWJCM en un modelo de DP

Habiendo esclarecido que HA hWJCM mantiene las propiedades angiogénicas, y ergo las potencialidades funcionales del secretoma de las hWJ MSC, el siguiente objetivo fue establecer si el polímero bioactivado sería capaz de regular los signos de DP inducida con IMQ en ratones. Para ello se utilizó un protocolo experimental de 12 días de inducción y se realizaron 3 tratamientos a partir del cuarto día de inducción con la

finalidad de evaluar el potencial terapéutico de HA hWJCM, comparando con hWJCM y HA Ctrl. Durante el periodo de inducción, el índice PASI al igual que la variación de peso porcentual de los animales fueron calculados.

Es posible apreciar en las figuras 7A-D la evolución de los distintos parámetros que contribuyen al índice PASI durante 11 días. En el último día, la condición que presentó el puntaje total PASI más alto fue DP ($8,5 \pm 0,5$), seguido por aquellos tratados con HA Ctrl ($2,17 \pm 0,29$), HA hWJCM (2 ± 0), hWJCM ($0,5 \pm 0$) y finalmente Ctrl (0 ± 0).

Interesantemente en cuanto a la variación de peso de los animales respecto al primer día, se encontró que luego de la primera aplicación de IMQ, existe una pérdida de peso corporal. Este resultado es esperable, y coincide con reportes de literatura, dado que IMQ induce fuerte inflamación dérmica y llagas con el consecuente malestar de los animales, lo que afecta su capacidad de alimentación. Sin embargo, una vez iniciado el tratamiento de DP, los ratones a los cuales se les administró HA hWJCM, comenzaron a aumentar de peso y al último día de tratamiento, estos individuos tuvieron una recuperación prácticamente total ($\Delta = -2,51\%$), llegando a un valor cercano al de la condición Ctrl ($\Delta = -0,99\%$) resultado que no pudo verse en las demás condiciones experimentales. Seguido HA hWJCM, se encontraron los ratones tratados con hWJCM ($\Delta = -6,47\%$) y, por otro lado, se observó que ratones tratados con HA Ctrl disminuyeron su peso hasta un nivel cercano al de los ratones DP ($-9,84\%$ y $-12,11\%$ respectivamente), lo que se muestra en la figura 7E.

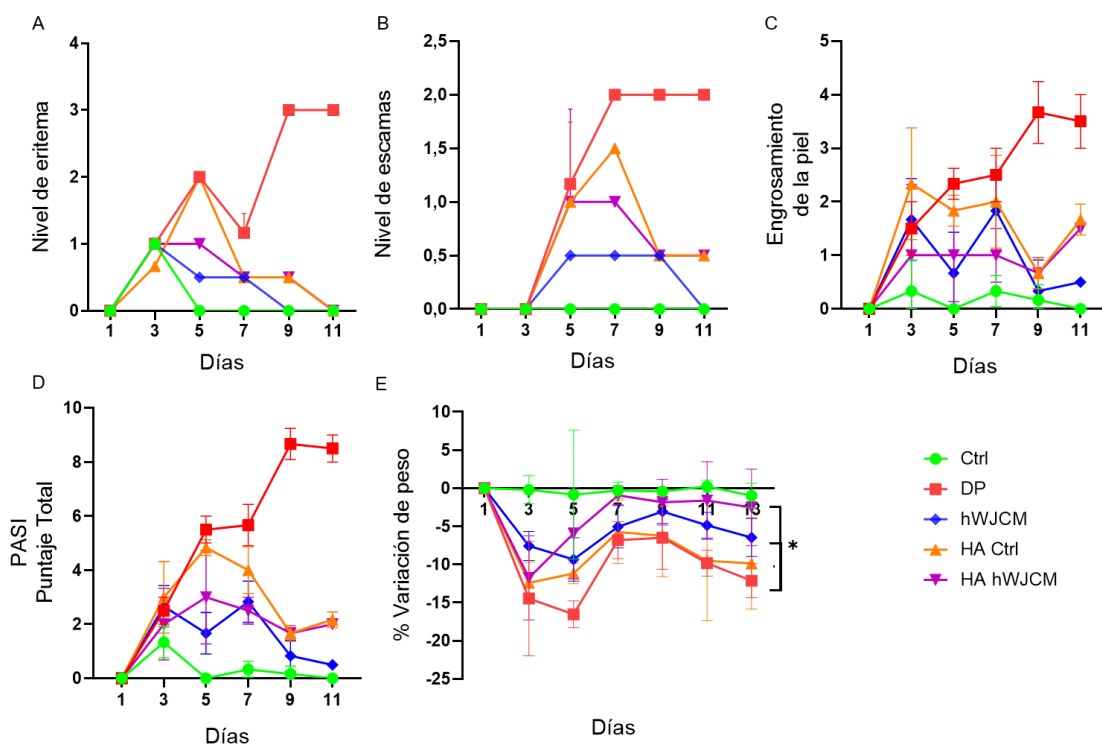


Figura 7. El tratamiento HA hWJCM disminuye el índice PASI y provoca la recuperación del peso corporal. Se muestra la evolución de las características de las lesiones psoriasiformes durante un periodo de 11 días: eritema (A), descamación (B) y engrosamiento de piel (C) para cada condición. Además, se muestra el puntaje total PASI para cada condición experimental (D) junto con la variación de peso porcentual de los animales respecto al primer día de inducción de DP (E), donde existen diferencias significativas entre Ctrl y las condiciones inducidas con DP a excepción de HA hWJCM ($P > 0,05$). En relación a la condición enferma DP, se observó una recuperación de peso significativa en los animales luego de los tratamientos hWJCM y HA hWJCM. Test de Mann-Whitney, $n=3$, $P < 0,05$.

Con los resultados obtenidos fue posible concluir que luego de tan solo 1 día de tratamiento, la administración subcutánea de hWJCM provocó una disminución drástica del índice PASI en comparación a HA Ctrl y HA hWJCM. Sin embargo, luego de 3 días de tratamiento, fue posible observar una tendencia de los tratamientos HA Ctrl y HA hWJCM a la reducción del índice PASI, siendo el último más eficaz y acercándose a valores obtenidos con hWJCM. Este último tratamiento, continuó disminuyendo el índice

PASI y al día 9 no fue posible encontrar diferencias significativas tras la comparación con la condición Ctrl, a diferencia de los tratamientos HA Ctrl y HA hWJCM. Hacia el día 11 se vio una reducción significativa del puntaje PASI para todas las condiciones inducidas con DP y que fueron tratadas, obteniéndose la mayor reducción para la condición hWJCM. Lo anterior se plasma en la figura 8A. En relación al espesor de piel, se vio que el tratamiento de DP provocó una disminución significativa de éste, lo que se muestra en la figura 8B.

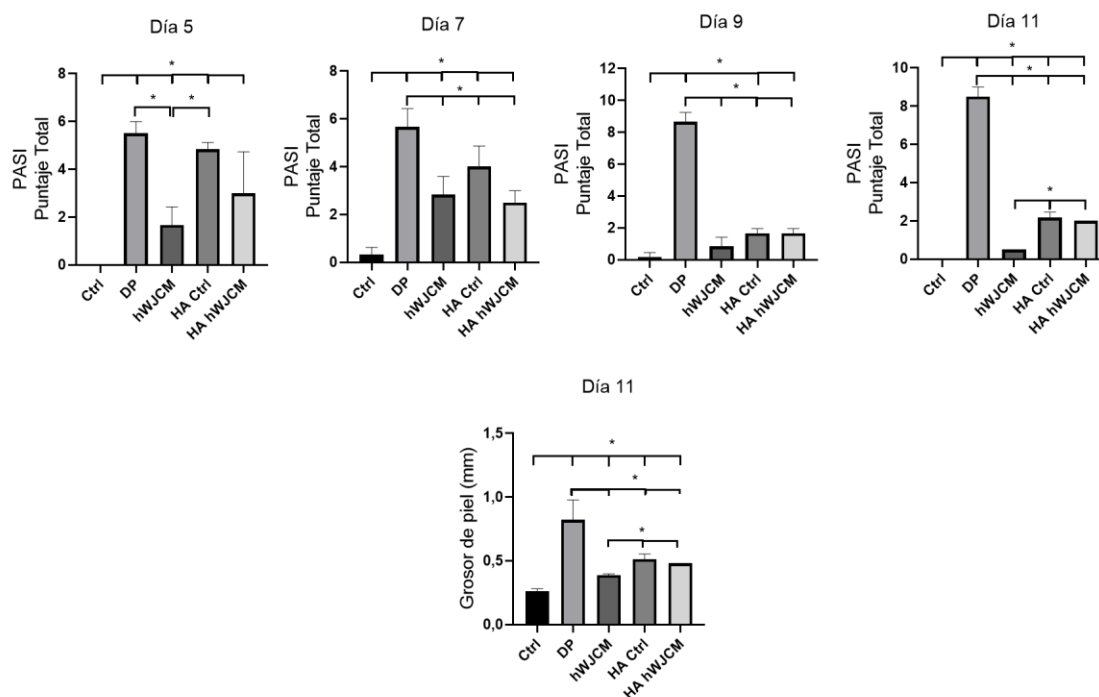


Figura 8. El tratamiento de DP con HA hWJCM disminuye el índice PASI de forma aguda al día 7 de tratamiento. (A) Se muestra el análisis estadístico de la evolución del índice PASI (luego de haber iniciado los tratamientos al día 4) a los días 5, 7 y 9. (B) Corresponde al análisis estadístico del grosor de la piel dorsal para las condiciones estudiadas al día 11. Test de Mann-Whitney $P < 0,05$, $n=3$.

La alta puntuación de PASI para los animales DP, está dada por un alto grado de eritema, descamación y engrosamiento de la piel. Por otro lado, la disminución de este

índice se debe a los cambios fenotípicos en la piel dorsal de los ratones inducidos con DP frente a los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM tal como se desprende de la figura 9, lográndose una reducción del índice PASI de 94,12%, 74,51%, y 76,47% respectivamente.

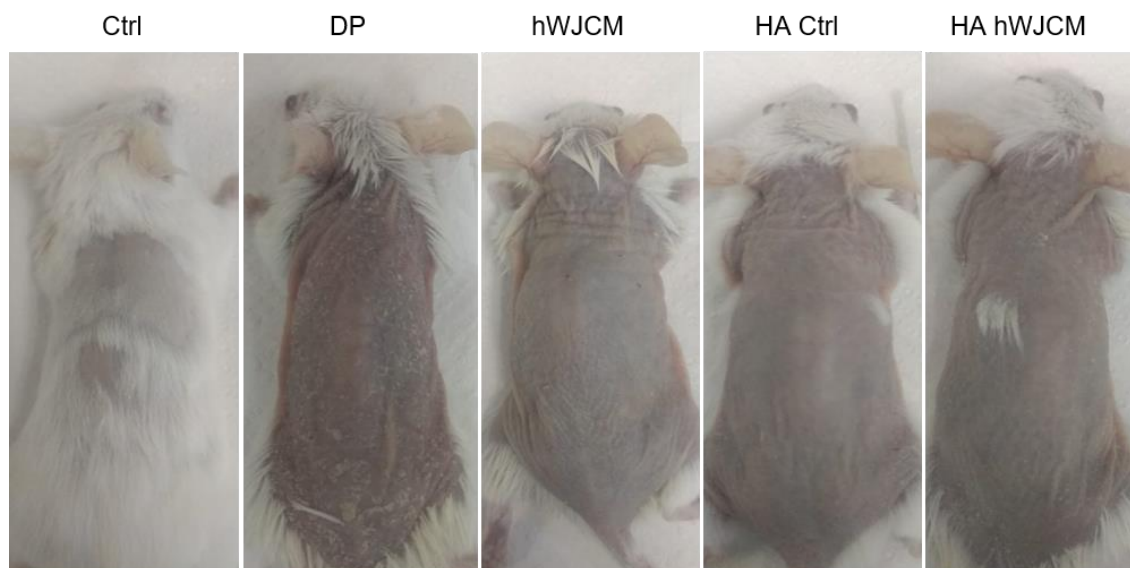


Figura 9. La administración de los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM disminuye las manifestaciones clínicas de DP. Se muestran fotografías representativas correspondientes a los cambios morfológicos en la piel de la zona dorsal de ratones al día 13 para los distintos grupos en estudio. En las condiciones hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM, se aprecia una disminución del nivel de eritema, escamas y grosor de la piel respecto a la condición DP.

Posteriormente a la eutanasia de los individuos, realizada el día 13, se procedió a remover el bazo e hígado de cada animal. Una vez hecho esto, no se vio un cambio en la apariencia de los hígados de las condiciones inducidas con DP respecto a Ctrl, obteniéndose finalmente valores de índice hepático bastante similares para todas las condiciones experimentales ($P > 0,05$). Muy por el contrario, fue posible evidenciar un incremento en el tamaño de los bazos de aquellos individuos inducidos con DP, tanto en su longitud como en el ancho, lo que se tradujo en un mayor índice esplénico para

dichos animales, los cuales resultaron ser significativamente mayores al obtenido en condición Ctrl ($P < 0,05$). Lo anterior se muestra en las figuras 10A y B respectivamente.

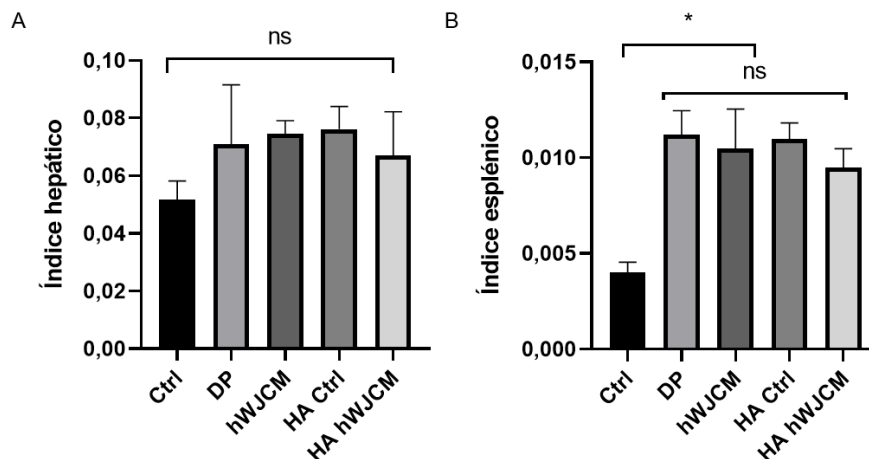


Figura 10. El tratamiento de DP no revierte la esplenomegalia. Se presenta en (A) el Índice hepático mientras que en (B) se presenta el Índice esplénico para las distintas condiciones experimentales. Análisis realizado al día 13 del protocolo experimental. Test de Mann-Whitney, $n=3$, $P < 0,05$.

Una vez que los animales fueron eutanasiados, se obtuvieron muestras de piel a partir de las cuales se realizaron tinciones de H&E para analizar en detalle la histología en las diferentes condiciones experimentales, lo que se muestra en las figuras 11A-E. En la condición DP, fue claramente observada acantosis, paraqueratosis, el alargamiento de las crestas epidérmicas e infiltrado celular. Frente al tratamiento con hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM, se observó una disminución de la hiperplasia epidermal y del fenómeno de paraqueratosis, mientras que, en relación al infiltrado celular en la dermis, solamente se vio una disminución considerable frente al tratamiento HA hWJCM. En relación a la condición Ctrl, no se apreciaron manifestaciones histológicas psoriasiformes. La condición DP presentó el mayor grosor de epidermis seguido de una disminución extremadamente significativa en los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM ($P <$

0,0001), obteniéndose un resultado similar para estos últimos. Los grosores epidérmicos de las condiciones inducidas con DP fueron significativamente mayores a los de la condición Ctrl ($P < 0,0001$), lo que se encuentra plasmado en la figura 11F.

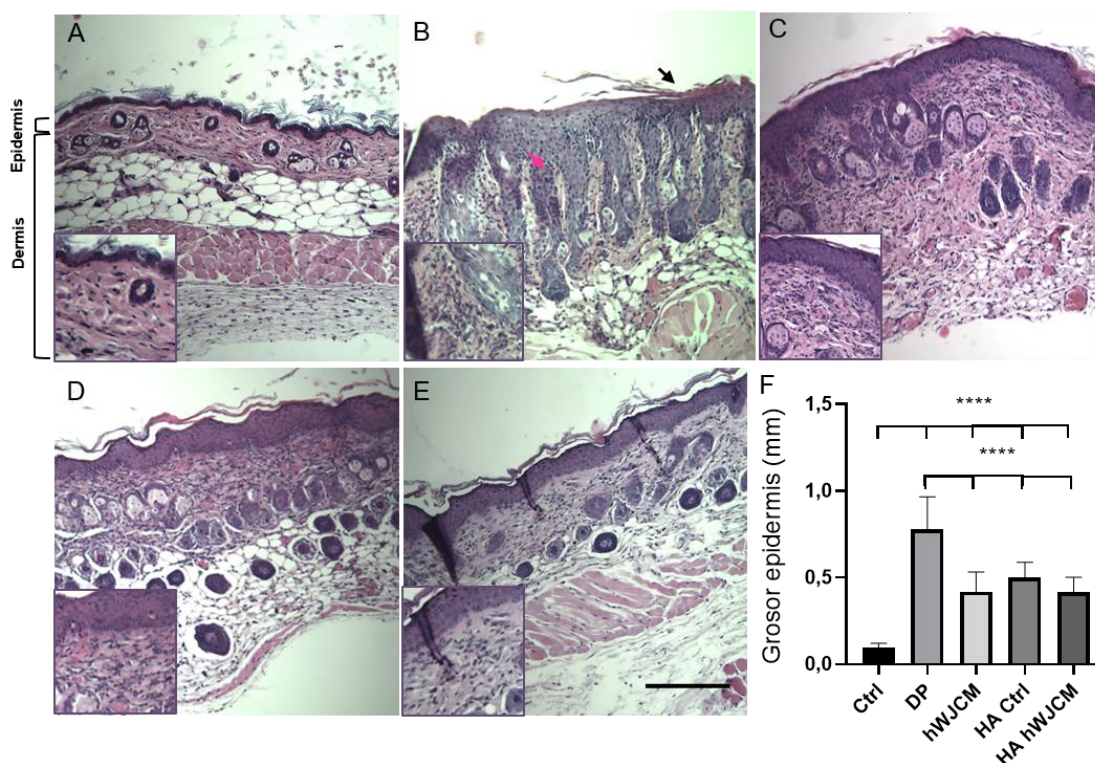


Figura 11. El grosor de la epidermis se reduce frente al tratamiento de DP. Se muestran cortes histológicos de piel sometidos a tinciones de H&E para las distintas condiciones en estudio. **(A)** corresponde a Ctrl, **(B)** corresponde a DP y en la imagen se muestran los fenómenos de paraqueratosis (flecha negra), elongación de crestas epidérmicas (flecha rosada) e infiltrado celular (recuadro). En **(C)** se observa un corte histológico de hWJCM, **(D)** corresponde a HA Ctrl y finalmente en **(E)** se muestra HA hWJCM, barra = 1,5 mm. En todas las condiciones exhibidas, se adjunta un aumento de la dermis (recuadro). **(F)** Corresponde a la cuantificación del grosor de epidermis de los cortes provenientes de las distintas condiciones experimentales. ANOVA de una vía con múltiples comparaciones, $n=15$, $P < 0,001$.

Las pieles a partir de las cuales se obtuvieron las muestras histológicas, fueron fotografiadas, para observar con mayor detalle la estructuración de los vasos sanguíneos. Se vio que la inducción de DP con IMQ sin tratamiento, provocó un

aumento en la vascularización y la formación de vasos sanguíneos tortuosos, los cuales interesantemente se mantuvieron tras los tratamientos con hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM. En adición a lo anterior, se realizó una inmunohistoquímica para CD31, con el objetivo de marcar células endoteliales, dado el proceso de angiogénesis aberrante que ocurre en animales enfermos con DP. Gracias a ello, fue posible observar a nivel histológico un incremento en la vascularización para la condición DP junto con vasos dilatados y tortuosos. Lo previamente mencionado se muestra en la figura 12A.

En relación a la vasculatura dorsal, se realizó un análisis detallado y se encontró que la administración de tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM, disminuyó la formación de nuevos vasos sanguíneos, siendo más drástico en el caso de las últimas dos condiciones mencionadas, en las cuales se obtuvieron valores cercanos tal como se observa en la figura 12B. Al momento de considerar el número de vasos sanguíneos tortuosos al día 13, solamente se pudo apreciar una disminución significativa para la condición HA hWJCM ($P < 0,05$). Respecto al índice de tortuosidad de los vasos presentes en las distintas condiciones, se logró una reducción para los tratamientos HA Ctrl y HA hWJCM aunque solamente logró ser significativa en el último caso ($P < 0,01$), mientras que al momento de analizar la complejidad de las estructuras tortuosas, se observó únicamente una reducción extremadamente significativa para el tratamiento HA hWJCM ($P < 0,0001$).

Si bien, a simple vista se encontró que los vasos sanguíneos principales de la condición DP presentaban un diámetro mayor a los apreciados en la condición Ctrl, las ramificaciones más recientes eran de un diámetro considerablemente menor a la condición Ctrl. Por otro lado, se obtuvo que los distintos tratamientos generaron estructuras vasculares de un mayor diámetro en comparación a lo observado en la

condición DP ($P < 0,0001$), llegando a ser éstos similares a los presentes en la situación Ctrl. Lo anterior se muestra en la figura 12F.

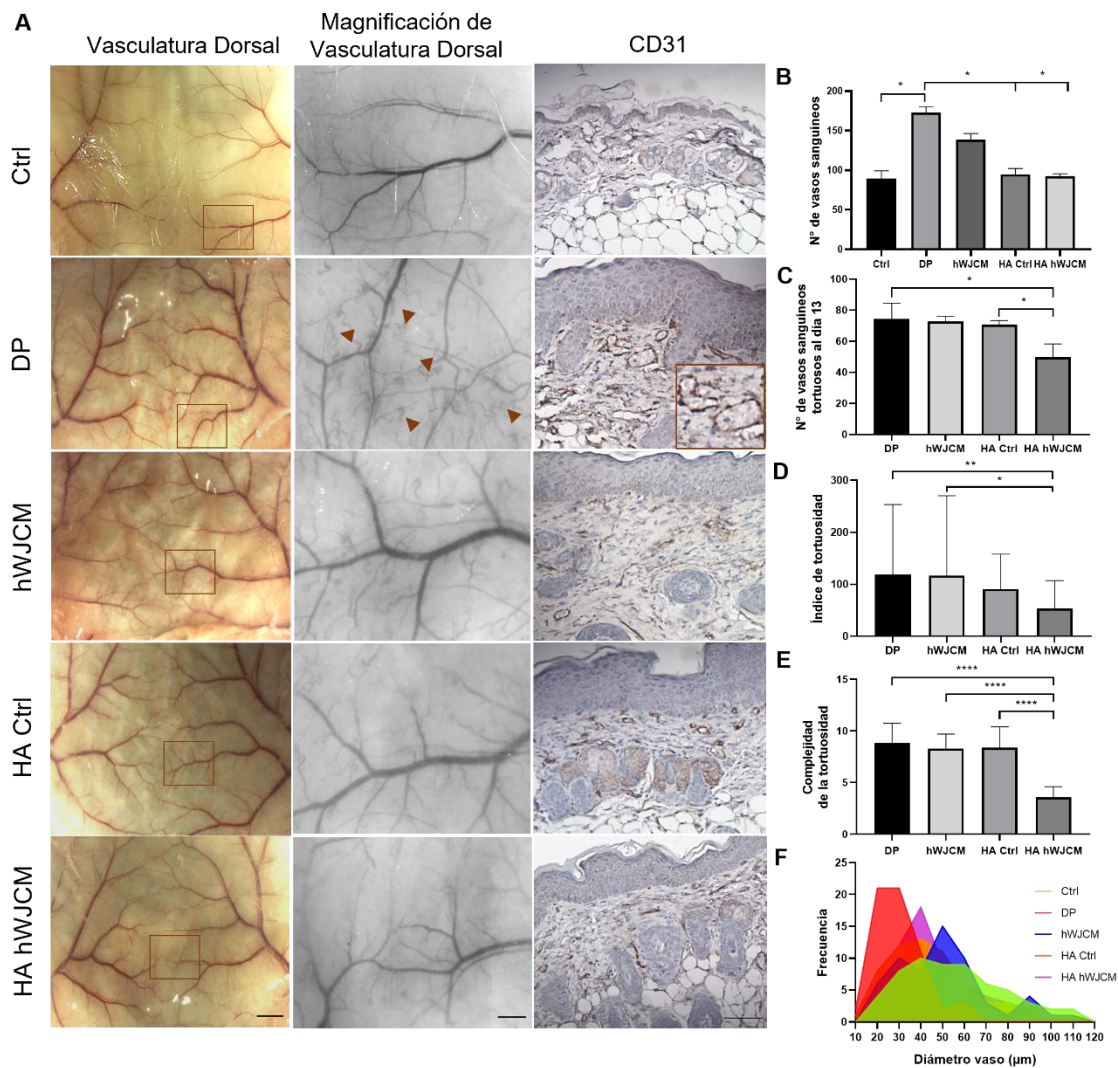


Figura 12. El tratamiento con HA hWJCM reduce tanto el número de vasos sanguíneos normales como tortuosos y recupera el diámetro de éstos. (A) Se muestran imágenes de alta y baja magnificación (recuadro resaltado) y las imágenes resultantes tras la tinción de CD31 de secciones de piel representativas de las distintas condiciones experimentales al día 13. Comparado con el grupo Ctrl, DP muestra un aumento en el número de vasos y también presencia de vasos tortuosos con forma serpenteante y espiral. Barra = 2,5 mm para imágenes de baja potencia, Barra = 0,5 mm para imágenes de alta potencia y tinción de CD31. Se indica en **(B)** el número de vasos sanguíneos correspondientes a las nuevas ramificaciones de los vasos

sanguíneos principales. Test de Mann-Whitney, $n=3$, $P < 0,05$. **(C)** Se muestra el número total de vasos sanguíneos tortuosos por condición. Test de Mann-Whitney, $n=3$, $P < 0,05$. En **(D)** se observa el índice de tortuosidad para los distintos grupos experimentales, el cual se reduce significativamente en los individuos tratados con HA hWJCM. ANOVA de una vía con múltiples comparaciones, $n = 60$, $P < 0,05$. **(E)** La complejidad de la tortuosidad, expresada como el número de segmentos totales hasta un vaso tortuoso, mostró una reducción significativa en el tratamiento HA hWJCM en comparación con la condición DP, siendo incluso significativamente diferente a los tratamientos hWJCM o HA Ctrl. ANOVA de una vía con múltiples comparaciones, $n = 30$, $P < 0,05$. En relación al diámetro de los vasos sanguíneos **(F)** se muestra la distribución de los vasos sanguíneos contabilizados en **(B)** para las condiciones experimentales. Existen diferencias significativas entre Ctrl y HA Ctrl (*). También se encontraron diferencias extremadamente significativas entre DP y Ctrl, hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM (****). Test Kolmogorov-Smirnov, $n=60$, $P < 0,05$.

DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES

La psoriasis, al ser una enfermedad de carácter autoinmune, no tiene cura, solamente tratamientos paliativos, los cuales han demostrado ser incómodos, no siempre efectivos, complicados, costosos y causantes de efectos secundarios adversos, lo que provoca una disminución en la adherencia a ellos por parte de los pacientes. La calidad de vida de los pacientes psoriásicos se ve gravemente afectada de acuerdo a la severidad de la patología. Sin embargo, esta puede mejorar considerablemente con el tratamiento adecuado.

La medicina regenerativa basada en el uso de MSC, ha demostrado ser efectiva en otras patologías tales como dermatitis atópica, lupus cutáneo eritematoso y dermatitis alérgica por contacto (Shin y col., 2017). Actualmente, debido a las desventajas que presenta el uso de MSC como tal, se han realizado avances hacia tratamientos sin el uso de células, lo que ha provocado la búsqueda de maneras para conservar y almacenar el secretoma de las células y/o componentes terapéuticos, sin que se pierdan las propiedades de interés. Se ha visto que una posible manera estable de almacenar el secretoma durante un largo periodo, corresponde al proceso de liofilización que permite generar un polvo con los componentes bioactivos. Sin embargo, es probable que ocurra una disminución en la actividad biológica de los compuestos liofilizados (Fernandes-Cunha y col., 2019). Para evitar la destrucción y por lo tanto mantener la integridad y estructura de los componentes del secretoma, se requiere la adición de un compuesto criopreservante (Bari y col., 2018; Romanov y col., 2019). Como ha sido reportado que el HA posee propiedades criopreservativas, en el presente trabajo fue estudiado como soporte para generar un tratamiento novedoso enfocado a las lesiones cutáneas causadas por la psoriasis, basado en la combinación con los factores secretados por hWJ MSC.

En primer lugar, las células aisladas a partir de la gelatina de Wharton, cumplieron dos de los requisitos establecidos por ISCT (Dominici y col., 2006), siendo éstos la adherencia al plástico además de la expresión de marcadores de superficie de MSC y ausencia de marcadores de superficie de células hematopoyéticas. Si bien no se realizó la diferenciación *in vitro* de las células obtenidas, si se pudo apreciar la morfología fibroblastoide de estas, lo que sugiere fuertemente que las células correspondieron efectivamente a hWJ MSC. Cabe señalar que la diferenciación de estas células a linajes mesodérmicos ha sido reportada previamente por el laboratorio de la Dra. Palma, y forma parte de los protocolos de rutina para verificar los cultivos primarios.

Una vez comprobado lo anterior, el hWJCM fue recolectado luego de 48 horas de cultivo con el fin de producir un biopolímero altamente poroso y flexible, utilizando como soporte HA. Una vez obtenido este biopolímero de HA hWJCM, semejante a una esponja, se llevó a cabo un ensayo CAM *in vivo* para evaluar si el potencial angiogénico descrito previamente para hWJCM (Edwards y col., 2014) se mantenía en la nueva composición polimérica tras el proceso de liofilización. Puesto que se ha descrito que la pérdida de las propiedades funcionales de componentes terapéuticos podría ser generada por cambios conformacionales de proteínas liofilizadas además de transformaciones no deseadas de compuestos activos y/o excipientes. (Roy & Gupta, 2004; Ohtake y col., 2020). Los resultados obtenidos demostraron que HA hWJCM promovió la formación de nuevos vasos sanguíneos, obteniéndose un valor muy similar a lo alcanzado con hWJCM y al control positivo VEGF, indicando que el tratamiento es angiogénico y que por lo tanto los componentes de hWJCM mantienen sus propiedades angiogénicas en la nueva composición tras el proceso de liofilización. A pesar que sorpresivamente el estímulo HA Ctrl generó un aumento en el número de vasos totales, este no fue

considerado como significativo. A su vez, HA Ctrl también provocó un engrosamiento significativo de los vasos sanguíneos estimulados en comparación a aquellos estimulados con DMEM SRF. Lo anterior estaría indicando que HA Ctrl a pesar de contar con un alto peso molecular, propiedad a la cual se le han atribuido efectos antiinflamatorios previamente (Cooper y col., 2008), estaría actuando como un agente inflamatorio durante el desarrollo embrionario de *Gallus gallus*. Esto podría deberse a que HA Ctrl al entrar en contacto con el medio acuoso dentro del huevo interactúe con hialuronidasas, enzimas hidrolíticas que provoquen su degradación en unidades más pequeñas, tornándose así de bajo peso molecular y por lo tanto provocando un aumento en la expresión de citoquinas pro angiogénicas como VEGF y TNF- α , finalmente teniendo un efecto proinflamatorio, como ha sido sugerido previamente (West y col., 1984; Pardue y col., 2008; Ribatti, 2010). Por otro lado, en relación al diámetro de los vasos sanguíneos de las condiciones restantes VEGF, hWJCM y HA hWJCM, fue observado un aumento significativo respecto a lo notado en Ctrl, lo cual sugiere un efecto en la maduración de los vasos sanguíneos o proliferación de las células endoteliales por acción de los estímulos.

Al observar que las propiedades angiogénicas de HA hWJCM, atribuidas principalmente a los factores de hWJCM, se mantuvieron tras el proceso de liofilización, se infirió que posiblemente el resto de las propiedades terapéuticas que caracterizan a hWJCM también fueron conservadas. Tal suposición se corroboró más tarde en un modelo murino de dermatitis psoriasiforme. Ha sido reportado que la aplicación de IMQ en este modelo provoca deshidratación en los individuos, lo que a su vez contribuye a cambios que ocurren en la estructura de la piel, como es el aumento de la tensión y descamación en esta (Horváth y col., 2019). Lo anterior es concordante con los resultados obtenidos,

pues en la condición DP sin tratamiento, se observó el desarrollo de la patología reflejándose en un alto índice PASI. Si bien durante la inducción de DP, se apreció una mejora leve en cuanto al grado de eritema entre los días 5 y 7 en los animales no tratados, esto no fue inesperado, puesto que se ha registrado que la expresión de interleucinas implicadas en el desarrollo de la enfermedad son expresadas de manera transitoria (van der Fits y col., 2009) y que, además, IMQ genera una respuesta adaptativa en la piel de ratón tras su constante aplicación (Na Takuathung y col., 2018). Por otro lado, en el caso de los tratamientos hWJCM, HA Ctrl y HA hWJCM, se apreció una disminución drástica del índice PASI siendo el mayor efecto atribuido a hWJCM. Esto posiblemente se deba al método de administración más invasivo de los factores antiinflamatorios (lo que disminuye el número de barreras biológicas que debe atravesar el tratamiento para llegar al tejido de interés, la dermis) y por la naturaleza acuosa de hWJCM, lo que contribuiría a una reducción de la deshidratación ocasionada por IMQ y por lo tanto mejoraría el aspecto de la piel. Si bien no se realizó la administración tópica del secretoma, ha sido descrito que la aplicación tópica de BM MSC CM de ratas disminuye la inflamación causada por IMQ luego de tan solo 3 días de tratamiento al reducir el grosor de la piel al mismo nivel que fluocinolona, un potente corticoesteroide (Sarycheva y col., 2019). Interesantemente, a pesar del perfil pro angiogénico reportado para hWJCM previamente (Edwards y col., 2014), se apreció una disminución en el grado de eritema en los individuos tratados con este y HA hWJCM. Esto último es particularmente relevante pues indicaría que frente a un contexto psoriasiforme *in vivo*, caracterizado por una inflamación permanente, los componentes anti angiogénicos de hWJCM adquieren un mayor protagonismo y que no se atribuye esta actividad al tipo de factores presentes, sino más bien a un balance entre los componentes que promueven la angiogénesis y aquellos que la inhiben (Pardue y col., 2008), sumado a un posible

efecto de disminución en la activación de células endoteliales al igual que queratinocitos, por efecto de hWJCM, que tiene como consecuencia una reducción en la liberación de factores proinflamatorios.

Por otra parte, los resultados obtenidos para HA Ctrl y HA hWJCM indicaron que la reducción del índice PASI para ambos tratamientos fue similar. Sin embargo, al momento de considerar la variación de peso de aquellos individuos sometidos al tratamiento HA hWJCM, se vio una recuperación prácticamente total luego de tan solo 4 días en comparación a individuos DP, HA Ctrl y hWJCM. Por lo mencionado previamente, sería necesario evaluar en detalle si efectivamente al día 9 del tratamiento, momento en que se dejan de ver diferencias entre ambas condiciones, los individuos de la condición HA hWJCM dejan de responder al tratamiento o si únicamente se debe a inconvenientes del proceso de liofilización, el cual aún se está optimizando, puesto que no todas las esponjas obtenidas inicialmente contaron con el mismo tamaño e igual consistencia, utilizándose hacia el final del experimento esponjas un poco más desintegradas que las primeras. Muy por el contrario, los animales tratados con HA Ctrl no mantuvieron su peso corporal constante, este disminuyó casi al mismo nivel de DP. Si bien se ha descrito que HA de alto peso molecular disminuye los efectos proinflamatorios de ciertas moléculas y posee un efecto analgésico (Cooper y col., 2008; Gupta y col., 2019), el fracaso del tratamiento en provocar un aumento del peso, indicaría que este no es capaz de penetrar la piel para ejercer su acción o que la dosis utilizada de HA Ctrl no sería suficiente para disminuir el dolor asociado a la enfermedad, a diferencia de los tratados con HA hWJCM. Lo anterior plasma que el bienestar general producto del tratamiento HA hWJCM, se debe posiblemente a una sinergia de los efectos terapéuticos atribuidos a los compuestos presentes en él, los cuales

probablemente actúan en diversos puntos de la cascada de señalización que desencadena el dolor causado por la enfermedad, permitiendo finalmente que el animal pueda alimentarse, hidratarse y moverse sin sufrimiento.

En lo concerniente a la histología de la piel, se vieron las manifestaciones clásicas psoriásicas en los animales de la condición DP, contrario a lo observado en la condición Ctrl. Fue posible notar que los tratamientos HA Ctrl, hWJCM y HA hWJCM disminuyeron estas manifestaciones puesto que actuaron sobre los queratinocitos regulando su proliferación y reduciendo el grosor de la epidermis, lo cual sugiere que HA Ctrl a pesar de tener un alto peso molecular es capaz de penetrar la epidermis y dermis tal como ha sido reportado previamente (Brown y col., 1999). Por otro lado, en el caso de HA hWJCM no se observó paraqueratosis y a diferencia de los tratamientos HA Ctrl y hWJCM, ocurrió la disminución de la infiltración celular en la dermis. Lo anterior confirmaría la presencia de factores inmunomoduladores en HA hWJCM que disminuyen el reclutamiento de células propias del sistema inmune atraídas hacia la piel debido a los quimioatrayentes secretados por los queratinocitos moribundos o de comportamiento aberrante desencadenado por algún estresor (Wagner y col., 2010).

Si bien en este seminario de título no se realizaron experimentos para entender como actuó hWJCM en la piel psoriasiforme en relación a la expresión de citoquinas principales en el desarrollo de la afección, esto fue hecho para la línea de investigación principal en la cual se enmarcó este proyecto (Tesis de Doctorado en Biotecnología, USACH, Dra. Daniela Carrillo, 2020). En aquella investigación, se observó que la atenuación de las lesiones psoriasiformes se debe principalmente a una disminución significativa de las citoquinas proinflamatorias claves en el desarrollo de la enfermedad como TNF- α e IL-17A (Carrillo y col., datos no publicados). Sin embargo, es probable

que los diversos compuestos bioactivos de hWJCM actúen sobre más puntos en la vía de señalización que da origen a la patogénesis, pudiendo disminuir la presencia de otros agentes clave altamente expresados como lo son IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-22, IL-23, IFN- α e IFN- γ , lo cual ha sido previamente descrito para ratones DP tras la administración de UC MSC (Chen y col., 2019).

En relación a los órganos extraídos de los individuos pertenecientes a distintas condiciones, se observó el fenómeno de esplenomegalia. Esto podría ser causado por el ambiente inflamatorio constante y además puesto que el bazo es un órgano linfoide secundario en el cual ocurre la activación de linfocitos, el incremento en el tamaño total podría deberse de la proliferación de éstos. En cuanto al análisis de índice hepático, no se encontraron diferencias significativas entre las diversas condiciones. Esto podría indicar que el agrandamiento del hígado causado por la acción de citoquinas proinflamatorias, al cual se asocia la enfermedad de hígado graso no alcohólico, sería un efecto que se da a largo plazo o simplemente que la aplicación tópica de IMQ no es capaz de desencadenar esta comorbilidad.

En cuanto al proceso angiogénico, se ha informado que este permite aumentar el flujo sanguíneo con el fin de promover la reparación de heridas, algún proceso de remodelación o el crecimiento de un tejido en particular (Pardue y col., 2008). Sin embargo, se ha descrito angiogénesis aberrante en patologías como el cáncer o psoriasis. Lo anterior explicaría el aumento inicial del eritema en DP, dado por un engrosamiento de los vasos sanguíneos principales y surgimiento de capilares tortuosos (Guerard & Pouliot, 2012), además de numerosas ramificaciones de diámetro pequeño que son más permeables y carecen de células capaces de entregarles soporte como pericitos y células musculares (Armstrong y col., 2011). Es de suma importancia reducir

el proceso angiogénico aberrante, puesto que se ha reportado que los vasos tortuosos reducen o alteran el flujo sanguíneo, pudiendo generar isquemia en zonas distales. Si bien se asocia la vasculatura tortuosa a patologías, también se ha relacionado al proceso de reparación de heridas, apareciendo cerca del sitio de lesión para luego adquirir un fenotipo normal a medida que la herida comienza a sanar. Asimismo, se ha observado una contribución al proceso angiogénico al producirse brotes en los ápices de las regiones curvas de estos vasos, los que más tarde se convierten en estructuras estables que promueven la sanación (Chong y col., 2017).

La vasculatura tortuosa puede llegar a formarse producto del debilitamiento de la pared del vaso sanguíneo provocado por la degradación de compuestos de la MEC como lo es elastina o por la degradación de tejido conectivo (Han, 2012). Durante el proceso angiogénico, ocurre la degradación de la MEC por parte de proteasas, entre ellas metaloproteasas (MMP), las cuales además se han asociado a procesos de remodelación de tejidos, regulación de respuesta inflamatoria y vasodilatación (Mezentsev y col., 2014). Estas enzimas se encuentran inducidas a su vez por citoquinas proinflamatorias como lo son IL-1 β y TNF- α , y al degradar la MEC, se genera un cambio en la composición de ésta y factores proangiogénicos son liberados (Heidenreich y col., 2009; Masuko y col., 2009). Frente al tratamiento de DP se pudo apreciar que la cantidad de nuevos vasos sanguíneos formados se redujo, lo que finalmente provocó una disminución del flujo sanguíneo en la piel y por lo tanto una disminución del eritema. El tratamiento hWJCM generó una disminución en el número de vasos sanguíneos respecto a la condición DP, probablemente por los factores anti-angiogénicos presentes, sin embargo, se obtuvo un número de vasos sanguíneos mayor a lo observado en los tratamientos HA Ctrl y HA hWJCM. En adición a lo anterior, se

pudo observar vasos sanguíneos tortuosos en todas las condiciones inducidas con DP, obteniéndose la menor cantidad en la condición HA hWJCM. Se ha descrito que el hWJCM contiene MMP (Amable y col., 2014; Edwards y col., 2014; Carrillo y col., datos no publicados). Quizás el efecto de las MMP contenidas en hWJCM junto con las MMP presentes en las lesiones psoriasiformes y el resto de factores bioactivos proangiogénicos encontrados en el secretoma, exacerbaban la remodelación de vasos sanguíneos existente en el contexto psoriasiforme impidiendo la correcta maduración y estabilización de ellos, finalmente evitando la regresión de las estructuras tortuosas. Por otra parte, tras el tratamiento de HA Ctrl, igualmente permanecieron en gran parte los vasos sanguíneos tortuosos, sin embargo, en la condición HA hWJCM, se observó una estructuración más cercana a la condición Ctrl de la vasculatura dorsal. Se ha demostrado que HA es capaz de reducir la expresión de MMP previamente inducidas por IL-1 β a nivel de ARN mensajero (ARNm) y proteína, siendo sugerido que HA inhibe la unión de IL-1 β hacia su receptor (Sasaki y col., 2004; Wu y col., 2017). Sorprendentemente a pesar de lo anterior, el tratamiento HA Ctrl, no logró reducir significativamente el número de vasos tortuosos, pero en el tratamiento con el polímero bioactivado si se evidenciaron diferencias significativas, indicando una posible sinergia en el efecto causado por la combinación de los componentes que lo conforman. Sin embargo, se observó una disminución en el índice de tortuosidad para HA Ctrl aunque no fue significativa, pero que si lo fue para el tratamiento de HA hWJCM. Esto significa que ocurrió una disminución del largo o del grado de curvatura de los vasos sanguíneos tratados en relación a la condición enferma. Por otro lado, al momento de considerar la complejidad de los vasos tortuosos, se observó nuevamente que la única condición en la cual se apreció una diferencia significativa respecto al grupo DP fue HA hWJCM, lo que se tradujo en una reducción del grado de arborización respecto a las demás

condiciones, patrón estructural que también se observa en otras enfermedades de la piel (Jin y col., 2017). El hallazgo que HA hWJCM es capaz de revertir en parte la vasculatura tortuosa hacia una normal, es extremadamente relevante puesto que no se ha logrado observar tal resultado con los tratamientos actuales para psoriasis.

Ha sido descrito que pacientes tratados con ciclosporina y etanercept, agentes sistémicos capaces de modular el proceso angiogénico, durante tres meses y veinticuatro semanas respectivamente, no presentan lesiones eritematoescamosas una vez finalizado un tratamiento (Stinco y col., 2007; Stinco y col., 2013). Sin embargo, en ninguno de los casos mencionados ocurre la regresión desde una vasculatura tortuosa hacia una normal, pudiendo llegar a presentarse hasta por 9 meses luego de la desaparición de las lesiones psoriásicas (Stinco y col., 2007; Stinco y col., 2013; Micali y col., 2010), contrastante a la disminución significativa que fue lograda con el tratamiento HA hWJCM luego de tan solo 9 días. Esto sugiere que HA hWJCM podría estar acelerando el proceso de reparación en las lesiones psoriasiformes.

Se conoce que el fenómeno de angiogénesis en psoriasis precede a la hiperplasia de la epidermis (Armstrong y col., 2011), Lo cual sugiere que, si la vasculatura de la piel enferma no regresa a la normalidad una vez finalizado el tratamiento de la patología, probablemente ocurra una reaparición de las lesiones distintivas (Bhushan y col., 1999; Stinco y col., 2007).

En el caso del tratamiento HA Ctrl se encontraron diferencias significativas en el diámetro de los vasos sanguíneos respecto a la condición Ctrl, siendo los vasos sanguíneos tratados con HA Ctrl más delgados, sugiriendo que en el contexto psoriasiforme HA Ctrl no es hidrolizado, manteniendo su alto peso molecular y por lo tanto sus propiedades antiinflamatorias. Asimismo, se podría atribuir la disminución en

el diámetro de los vasos a un efecto inhibitorio de HA Ctrl en la proliferación de células endoteliales tal como se ha reportado previamente (Pardue y col., 2008). Por otra parte, el tratamiento de DP con HA hWJCM y hWJCM, además de la disminución significativa en el número de nuevas ramificaciones, provocó un aumento en el diámetro de los vasos sanguíneos acercándose a lo observado en la condición Ctrl. Lo anterior podría estar dado por la inhibición de: la síntesis, liberación y/o acción tanto de citoquinas proinflamatorias como de factores tales como VEGF, angiopoyetinas, bFGF y HIF-1, entre otros (Armstrong y col., 2011) que actúan sobre las células endoteliales, lo que permitiría finalmente la correcta estabilización de los vasos sanguíneos.

Si bien el modelo murino de dermatitis psoriasiforme no reproduce exactamente la fisiopatología de psoriasis vulgaris, es un modelo que ha permitido entender aspectos de la enfermedad puesto que existen vías de señalización en común, lo cual podría implicar que HA hWJCM sea capaz de disminuir la severidad de psoriasis vulgaris. Ante tal incertidumbre, el paso siguiente respecto a esta investigación correspondería a realizar un estudio clínico en pacientes, adecuando la dosis de HA hWJCM con el fin de producir el prototipo biopolimérico para humanos. Al ser la psoriasis una enfermedad de origen multifactorial, el tratamiento propuesto tendría las ventajas de presentar diversos compuestos capaces de regular coordinadamente las manifestaciones angiogénicas, inmunológicas y morfológicas que caracterizan a la patología, actuando en diversos puntos claves, a diferencia del uso de un agente biológico con un espectro de acción bastante más acotado. Incluso podría servir para aliviar comorbilidades como la enfermedad del hígado graso no asociado a alcohol y artritis psoriásica puesto que disminuiría los factores proinflamatorios circulantes que exacerban dichas condiciones. Un punto a favor que tendría la administración de HA hWJCM, es que permitiría la

liberación local y controlada de los compuestos bioactivos dado por el material flexible y altamente poroso que conforma el biopolímero.

A diferencia de los tratamientos actuales, se esperaría que la administración tópica de HA hWJCM fuera fácil, de corta duración y realizable por el mismo usuario, puesto que al estar liofilizados los componentes bioactivos, es un producto altamente estable a temperatura ambiente y por lo tanto no requiere de un almacenamiento especial. Esto disminuiría significativamente el tiempo destinado a realizar el tratamiento y los costos asociados a éste.

Si HA hWJCM, llegara a reducir considerablemente el índice PASI en pacientes, sería interesante conocer el tiempo que el tratamiento regularía la psoriasis vulgaris. En el caso de estudio del uso de AD MSC CM en psoriasis de cuero cabelludo, una vez finalizado el tratamiento se realizó un seguimiento de 6 meses y se observó una continuación de la regresión de psoriasis durante ese periodo (Seetharaman y col., 2019). Por otro lado, en cuanto al uso de UC MSC para tratar psoriasis vulgaris en dos pacientes, se observó durante 4 y 5 años respectivamente la desaparición de las manifestaciones cutáneas de la enfermedad (Chen y col., 2016). Considerando que el efecto terapéutico de MSC se debe principalmente a la estromalidad, lo anterior sugiere que el tratamiento con HA hWJCM podría lograr la desaparición de las lesiones psoriásicas por un periodo extenso en pacientes con psoriasis vulgaris, sin embargo, se requiere mayor investigación al respecto. Si esto llegara a cumplirse supondría una ventaja respecto a la administración de UC MSC, puesto que los pacientes fueron tratados con un gran número de células, lo cual probablemente haya implicado un periodo prolongado de expansión *in vitro* o el uso de biorreactores (Mastrolia y col., 2019). Además, lo novedoso de HA hWJCM radica en que no es necesario mantener

células vivas, proliferativas y funcionales, lo que disminuye la preocupación de efectos no deseados tras la administración de estas como la migración a otro tejido, diferenciación no deseada y acceso desigual a nutrientes y oxígeno (Mastrolia y col., 2019). Sumado a lo anterior, no se requiere de inversión extra en factores ni condiciones estimulantes puesto que se utiliza hWJCM en su estado basal.

Se ha descrito que para tratamientos tópicos de psoriasis, existe un porcentaje extremadamente bajo de adherencia que oscila entre un 39-73%, a pesar que sea un aspecto fundamental para lograr resultados favorables (Bewley & Page, 2011). Esto se encuentra dado por la existencia pacientes que han cesado el uso de determinados agentes tópicos producto de su textura y/o consistencia, sensación grasa que deja en la piel, una gran inversión de tiempo y ser de baja eficacia. El tratamiento HA hWJCM, tendría las ventajas de ser cómodo para el usuario, puesto que, durante la administración, la esponja entra en contacto con agua y se disuelve instantáneamente sin dejar la piel grasosa, cumpliendo así con las preferencias de los pacientes por lo que sería esperable un aumento en la adherencia al tratamiento.

CONCLUSIONES

La investigación realizada permite concluir de manera indudable que el biopolímero activado HA hWJCM es capaz de regular las manifestaciones clínicas de dermatitis psoriasiforme en un modelo murino, lo cual no se limita únicamente al aspecto físico y superficial de la piel, sino que también a cambios tanto morfológicos, angiogénicos e inmunológicos apreciados a nivel histológico. Esto fue reflejado en la disminución de un 76,47% en el índice PASI tras 9 días de tratamiento, lo que a su vez redujo el sufrimiento de los animales enfermos y provocó un bienestar general en éstos. Finalmente, los descubrimientos emergentes de esta investigación sugieren que podría ser un tratamiento más cómodo, simple, efectivo, económico y seguro para tratar psoriasis vulgaris en pacientes frente a las opciones actuales en el mercado.

BIBLIOGRAFÍA

- Amable, P. R., Teixeira, M. V. T., Carias, R. B. V., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. 2014. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res. Ther. Rev.* **5**: 1–13.
- Archier, E., Devaux, S., Castela, E., Gallini, A., Aubin, F., Le Maître, M., Aractingi, S., Bachelez, H., Cribier, B., Joly, P., Jullien, D., Misery, L., Paul, C., Ortonne, J. P., & Richard, M. A. 2012. Carcinogenic risks of Psoralen UV-A therapy and Narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: A systematic literature review. *J. Eur. Acad. Dermatol.*, **26**: 22–31.
- Armijo Fernandez, D., Valenzuela, F., Saint-Pierre Contreras, G., & Cortés González, A. 2020. Adalimumab for severe psoriasis in Chilean paediatric patients. *An. Bras. Dermatol.* **95**: 105–106.
- Armstrong, A. W., Voyles, S. V., Armstrong, E. J., Fuller, E. N., & Rutledge, J. C. 2011. Angiogenesis and oxidative stress: Common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J. Dermatol. Sci.*, **63**: 1–9.
- Baliwag, J., Barnes, D. H., & Johnston, A. 2015. Cytokines in psoriasis. *Cytokine.* **73**: 342–350.
- Bari, E., Perteghella, S., Di Silvestre, D., Sorlini, M., Catenacci, L., Sorrenti, M., Marrubini, G., Rossi, R., Tripodo, G., Mauri, P., Marazzi, M., & Torre, M. 2018. Pilot Production of Mesenchymal Stem/Stromal Freeze-Dried Secretome for Cell-Free Regenerative Nanomedicine: A Validated GMP-Compliant Process. *Cells*, **7**: 190.
- Bewley, A., & Page, B. 2011. Maximizing patient adherence for optimal outcomes in psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol.* **25**: 9–14.
- Bhushan, M., McLaughlin, B., Weiss, J. B., & Griffiths, C. E. M. 1999. Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, **141**: 1054–1060.
- Biehl, J. K., & Russell, B. 2009. Introduction to Stem Cell Therapy. *J. Cardiovasc. Nurs.* **24**: 98–103.
- Brown, T. J., Alcorn, D., & Fraser, J. R. E. 1999. Absorption of Hyaluronan Applied to the Surface of Intact Skin. *J Invest Dermatol.*, **113**: 740–746.
- Caplan, A. I. 2010. What's in a Name? *Tissue Eng. Part A.* **16**: 2415–2417.
- Caplan, A. I., & Correa, D. 2011. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell*, **9**: 11–15.
- Chen, H., Niu, J. W., Ning, H. M., Pan, X., Li, X. Bin, Li, Y., Wang, D. H., Hu, L. D., Sheng, H. X., Xu, M., Zhang, L., & Zhang, B. 2016. Treatment of Psoriasis with Mesenchymal Stem Cells. *Am. J. Med.* **129**: e13–e14.
- Chen, M., Peng, J., Xie, Q., Xiao, N., Su, X., Mei, H., Lu, Y., Zhou, J., Dai, Y., Wang, S., Li, C., Lin, G., & Cheng, L. 2019. Mesenchymal Stem Cells Alleviate Moderate-to-Severe Psoriasis by Reducing the Production of Type I Interferon (IFN-I) by Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs). *Stem Cells Int.* 2019.

- Chong, D. C., Yu, Z., Brighton, H. E., Bear, J. E., & Bautch, V. L. 2017. Tortuous Microvessels Contribute to Wound Healing via Sprouting Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**: 1903–1912.
- Cooper, C. A., Brown, K. K., Meletis, C. D., & Zabriskie, N. 2008. Inflammation and hyaluronic acid. *Altern. Complem. Ther.* **14**: 78–84.
- Cunningham, C. J., Redondo-Castro, E., & Allan, S. M. 2018. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *J. Cerebr. Blood F. Met.* **38**: 1276–1292.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**: 315–317.
- Du, H., Liu, P., Zhu, J., Lan, J., Li, Y., Zhang, L., Zhu, J., & Tao, J. 2019. Hyaluronic Acid-Based Dissolving Microneedle Patch Loaded with Methotrexate for Improved Treatment of Psoriasis. *ACS Appl. Mater. Inter.* **11**: 43588–43598.
- Edwards, S. S., Zavala, G., Prieto, C. P., Elliott, M., Martínez, S., Egaña, J. T., Bono, M. R., & Palma, V. 2014. Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration. *Angiogenesis*, **17**: 851–866.
- Feldman, S. R., & Krueger, G. G. 2005. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann. Rheuma. Dis.* **64**: 65–68.
- Fernandes-Cunha, G. M., Na, K. S., Putra, I., Lee, H. J., Hull, S., Cheng, Y. C., Blanco, I. J., Eslani, M., Djalilian, A. R., & Myung, D. 2019. Corneal Wound Healing Effects of Mesenchymal Stem Cell Secretome Delivered Within a Viscoelastic Gel Carrier. *Stem Cells Transl. Med.*, **8**: 478–489.
- Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., & Mayani, H. 2006. Células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin.* **58**: 498–511.
- Francis PJ, J. 2018. Biomedical Applications of Polymers - An Overview. *Curr. Trends Biomedical Eng. & Biosci.* **15**: 44–45.
- Fredriksson, T., & Pettersson, U. 1978. Severe psoriasis — Oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica.* **157**: 238-244.
- Furue, M., & Kadono, T. 2016. Psoriasis: Behind the scenes. *J. Dermatol.* **43**: 4–8.
- Gnecchi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., & Dzau, V. J. 2005. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.*, **11**: 367–368.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., & Dzau, V. J. 2008. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res.* **103**: 1204–1219.
- Gold, L. 2016. Topical therapies for psoriasis: Improving management strategies and patient adherence. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **35**: S36–S46.

- Gopi, S., Amalraj, A., Sukumaran, N. P., Haponiuk, J. T., & Thomas, S. 2018. Biopolymers and Their Composites for Drug Delivery: A Brief Review. *Macromol. Symp.*, **380**: 1–14.
- Guerard, S., & Pouliot, R. 2012. The Role of Angiogenesis in the Pathogenesis of Psoriasis: Mechanisms and Clinical Implications. *J Clin Exp Dermatol Res.* **2**.
- Gupta, A., El-Amin, S. F., Levy, H. J., Sze-Tu, R., Ibim, S. E., & Maffulli, N. 2020. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications. *J. Orthop. Surg. Res.* **15**: 1-9.
- Gupta, R. C., Lall, R., Srivastava, A., & Sinha, A. 2019. Hyaluronic acid: Molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Front. Vet. Sci.* **6**: 1–24.
- Han, H. C. 2012. Twisted blood vessels: Symptoms, etiology and biomechanical mechanisms. *J. Vasc. Res.* **49**: 185–197.
- Heidenreich, R., Röcken, M., & Ghoreschi, K. 2009. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**: 232–248.
- Horváth, S., Komlódi, R., Perkecz, A., Pintér, E., Gyulai, R., & Kemény, Á. 2019. Methodological refinement of Aldara-induced psoriasiform dermatitis model in mice. *Sci. Rep.* **9**: 1–8.
- Jin, H., Yang, M. Y., Kim, J. M., Kim, G. W., Kim, H. S., Ko, H. C., Kim, B. S., & Kim, M. B. 2017. Arborizing vessels on dermoscopy in various skin diseases other than basal cell carcinoma. *Ann. Dermatol.* **29**: 288–294.
- Kim, W. B., Jerome, D., & Yeung, J. 2017. Diagnosis and management of psoriasis. *Can. Fam. Physician.* **63**: 278–285.
- Kuroda, K., Sapadin, A., Shoji, T., Fleischmajer, R., & Lebwohl, M. 2001. Altered expression of angiopoietins and Tie2 endothelium receptor in psoriasis. *J. Investig. Dermatol.*, **116**: 713–720.
- Mao, A. S., & Mooney, D. J. 2015. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**:14452–14459.
- Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. 2019. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *Int. J. Stem Cell.* **12**: 218–226.
- Mastrolia, I., Foppiani, E. M., Murgia, A., Candini, O., Samarelli, A. V., Grisendi, G., Veronesi, E., Horwitz, E. M., & Dominici, M. 2019. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem Cells Transl. Med.* **8**: 1135–1148.
- Masuko, K., Murata, M., Yudoh, K., Kato, T., & Nakamura, H. 2009. Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: Not just for viscosity. *Int. J. Gen Med.* **2**: 77-81.
- Mezentsev, A., Nikolaev, A., & Bruskin, S. 2014. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene.* **540**: 1–10.

- Micali, G., Lacarrubba, F., Musumeci, M. L., Massimino, D., & Nasca, M. R. 2010. Cutaneous vascular patterns in psoriasis. *Int. J. Dermatol.* **49**: 249–256.
- Mocanu, M., Toader, M., Rezus, E., & Taranu, T. 2019. Aspects concerning patient adherence to anti-TNF α therapy in psoriasis: A decade of clinical experience. *Exp. Ther. Med.* **12**: 49874992.
- Na Takuathung, M., Wongnoppavich, A., Panthong, A., Khonsung, P., Chiranthanut, N., Soonthornchareonnon, N., & Sireeratawong, S. 2018. Antipsoriatic Effects of Wannachawee Recipe on Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis in BALB/c Mice. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*
- Novelli, L., Chimenti, M. S., Chiricozzi, A., & Perricone, R. 2014. The new era for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: Perspectives and validated strategies. *Autoimmun. Rev.* **13**: 64–69.
- Ohtake, S., Izutsu, K., & Lechuga-Ballesteros, D. 2020. Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications. En S. Ohtake, K. Izutsu, & D. Lechuga-Ballesteros (Eds.), *Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications*. pp: 57-58. Wiley-VCH, Weinheim.
- Olveira, A., Herranz, P., & Montes, M. L. 2019. Psoriasis and fatty liver: A harmful synergy. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **111**: 314–319.
- Onderdijk, A. J., Hekking-Weijma, I. M., Florencia E. F. & Prens, E.P. 2017. Surgical Denervation in the Imiquimod-Induced Psoriasiform Mouse Model. En B. E., Clausen, & J. D. Laman (eds.), *Inflammation: Methods and Protocols*. pp 75-81. Springer, New York.
- Pardue, E. L., Ibrahim, S., & Ramamurthi, A. 2008. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis*. **4**: 203–214.
- Rendon, A., & Schäkel, K. 2019. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 1–28.
- Ribatti, D. 2010. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis. En D. Ribatti (ed), *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis*: p 10, Springer, New York.
- Romanov, Y. A., Volgina, N. E., Dugina, T. N., Kabaeva, N. V., & Sukhikh, G. T. 2019. Effect of Storage Conditions on the Integrity of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles. *Bul. Exp. Biol. Med.*, **167**: 131–135.
- Roy, I., & Gupta, M. N. 2004. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol. Appl. Bioc.*, **39**: 165-177.
- Sarycheva, M. V., Nadezhdina, N. A., Nadezhdin, S. V., Bondarev, V. P., Mycic, A. V., Burda, Y. E., Pokrovskiy, M. V., Danilenko, L. M., & Peresyphkina, A. A. 2019. Investigating the effect of multipotent mesenchymal stromal cells secretome on imiquimod-induced psoriasis in rats. *J. Int. Pharm.Res.* **11**: 1656–1663.
- Sasaki, A., Sasaki, K., Kontinen, Y. T., Santavirta, S., Takahara, M., Takei, H., Ogino, T., & Takagi, M. 2004. Hyaluronate inhibits the interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells. *Tohoku J. Exp. Med.* **204**: 99–107.

- Schmitt, J., & Wozel, G. 2005. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*, **210**: 194–199.
- Seetharaman, R., Mahmood, A., Kshatriya, P., Patel, D., & Srivastava, A. 2019. Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media Ameliorate Psoriasis Vulgaris: A Case Study. *Case Rep. Dermatol. Med.*
- Shin, T. H., Kim, H. S., Choi, S. W., & Kang, K. S. 2017. Mesenchymal stem cell therapy for inflammatory skin diseases: Clinical potential and mode of action. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 244
- Soria, J. M., Barcia-González, J., Andrades, J. A., Romero, J., Monleón Pradas, M., & García Verdugo, J. M. 2008. Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso. *Trauma*, **20**: 15–22.
- Stinco, G., Lautieri, S., Valent, F., & Patrone, P. 2007. Cutaneous vascular alterations in psoriatic patients treated with cyclosporine. *Acta Derm. Venereol.* **87**: 152–154.
- Stinco, G., Buligan, C., Maione, V., Valent, F., & Patrone, P. (2013). Videocapillaroscopic findings in the microcirculation of the psoriatic plaque during etanercept therapy. *Clinical and Experimental Dermatology*, **38**: 633–637.
- Teixeira, F., & Salgado, A. 2020. Mesenchymal stem cells secretome: Current trends and future challenges. *Neural Regen. Res.* **15**: 75–77.
- Ueyama, A., Yamamoto, M., Tsujii, K., Furue, Y., Imura, C., Shichijo, M., & 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**: 135–143.
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. 2015. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* **35**: e00191
- Uylings, H., & van Pelt, J. 2002. Measures for quantifying dendritic arborizations. *Netw. Comput. Neural Syst.* **13**: 397–414.
- Valenzuela, F., Silva, P., Valdés, M. P., & Papp, K. 2011. Epidemiology and quality of life of patients with psoriasis in Chile. *Actas Dermosifiliogr.* **102**: 810–816.
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., Prens, E. P., & Lubberts, E. 2009. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* **182**: 5836–5845.
- Villamizar-Sarmiento, M. G., Moreno-Villoslada, I., Martínez, S., Giacaman, A., Miranda, V., Vidal, A., Orellana, S. L., Concha, M., Pavicic, F., Lisoni, J. G., Leyton, L., & Oyarzun-Ampuero, F. A. 2019. Ionic nanocomplexes of hyaluronic acid and polyarginine to form solid materials: A green methodology to obtain sponges with biomedical potential. *Nanomaterials.* **9**: 944.
- Virgilio, F., Maurel, B., Davis, M., Hamilton, G., & Mastracci, T. M. 2017. Vertebral Tortuosity Index in Patients with Non-Connective Tissue Disorder-Related Aneurysm Disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **53**: 425–430.

Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. 2017. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 1852

Wagner, E. F., Schonhaler, H. B., Guinea-Viniegra, J., & Tschachler, E. 2010. Psoriasis: What we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol.* **6**: 704–714.

West D., Hampson I., Arnold F., & K. S. 1984. Angiogenesis Induced by Degradation Products of Hyaluronic Acid. *Science.* **228**: 1324–1326.

Wu, P. T., Kuo, L. C., Su, F. C., Chen, S. Y., Hsu, T. I., Li, C. Y., Tsai, K. J., & Jou, I. M. 2017. High-molecular-weight hyaluronic acid attenuated matrix metalloproteinase-1 and-3 expression via CD44 in tendinopathy. *Sci. Rep.* **7**: 1–10.

Zhang, P., & Wu, M. X. 2018. A clinical review of phototherapy for psoriasis. *Lasers Med. Sci.* **33**:173–180.