



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“EVALUACIÓN DEL PERFIL  
INMUNOMODULADOR DEL  
SECRETOMA DE CÉLULAS  
ESTROMALES MESENQUIMALES  
HUMANAS DE GELATINA DE  
WHARTON PRETRATADAS CON  
ANTÍGENO SOLUBLE DE *Leishmania  
braziliensis*”

TESIS PARA OPTAR  
EL GRADO DE  
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

CECILIA ISABEL PAJUELO REYES

LIMA - PERÚ

2022



**ASESOR**

Mg. Willy Manuel Cerón Tello

**COASESOR**

Dr. Juan Rigoberto Tejedo Huamán

**JURADO DE TESIS**

MG. JOSE LUIS AGUILAR OLANO

PRESIDENTE

MG. MARCO ANTONIO ISAIAS CABELLO NAPURI

VOCAL

MG. MIGUEL AUGUSTO MENDOZA FUENTES

SECRETARIO

## DEDICATORIA

*A mi mamá y mis abuelitos  
“Mamá Vea” y “Papá  
Mimín”, por criarme y darme  
su amor y confianza en cada  
paso que he dado.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por haberme formado en el campo de la inmunología en estos tiempos tan difíciles de pandemia. A los excelentes profesores y a mis compañeros a lo largo de la maestría.

A mi asesor interno, el Mg. Willy Manuel Cerón Tello, por su guía en el planteamiento de este proyecto de tesis y su apoyo. A mi mentor y asesor externo, el Dr. Juan R. Tejedo Huamán, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar mi tesis en el Instituto de Enfermedades Tropicales y a su vez realizar dos pasantías internacionales en España y Chile. Por su constante apoyo y consejos que sin duda me hicieron crecer a nivel profesional y cultivaron mi dedicación al campo de las células madre.

Al equipo del laboratorio de la Universidad Pablo de Olavide en España, a la Dra. Gladys M. Cahuana por su apoyo y consejos y Ana Paula por ser mi compañía en ese mes de pasantía y compartir los dilemas del mundo del cultivo.

Al equipo del Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular de la Universidad de los Andes en Chile. A la Dra. Patricia Luz Crawford por la increíble oportunidad de realizar la pasantía en su laboratorio y poder conocer el gran trabajo que hacen. A Alison por ser mi compañía en los almuerzos y a lo largo del mes de pasantía.

A todos mis amigos del Instituto de Enfermedades Tropicales de la UNTRM. Julio, Angelica, Marianella, Indira, Carlita, Rocio, Rodney por su apoyo y compañerismo en el desarrollo de mi tesis y ser un soporte en esas largas horas de trabajo. A los doctores Rafael Tapia y Stella Chenet por sus consejos y apoyo.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

La presente tesis fue financiada en su totalidad por la entidad FONDECYT, mediante el proyecto Contrato N° 09-2019-FONDECYT-BM-INC.INV “Implementación de una plataforma de referencia para el Control y Vigilancia de Enfermedades Parasitarias de Alto Impacto en el Perú y Desarrollo de un Dispositivo Multidiagnóstico en Puntos de Atención al Paciente”

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>ASL</b>	Antígeno soluble de <i>Leishmania braziliensis</i>
<b>BSL2</b>	Laboratorio de bioseguridad 2
<b>CCL1</b>	Ligando 1 de quimioquina
<b>CEM</b>	Células Estromales Mesenquimales
<b>CEMh</b>	Células Estromales Mesenquimales humanas
<b>CTV</b>	Cell Trace Violet stain
<b>CXCL10</b>	Ligando 10 de quimioquina
<b>CXCL9</b>	Ligando 9 de quimioquina
<b>DAP</b>	Doblaje Acumulativo Poblacional
<b>DMEM</b>	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento hepatocitario
<b>HLA-DR</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2
<b>IDO</b>	Idoleamina
<b>IET</b>	Instituto de Enfermedades Tropicales
<b>IGFBP-4</b>	Proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-17</b>	Interleucina 17

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina 1 alfa
<b>IL-3</b>	Interleucina 3
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>iNOS</b>	Oxido nítrico sintasa inducible
<b>IP</b>	Índice de proliferación
<b>ISCT</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LPS</b>	Lipopolisacarido
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de macrófagos
<b>MCP-3</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 3
<b>MINSA</b>	Ministerio de Salud
<b>MIP-1b</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos tipo 1b
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLR</b>	Mixed Lymphocyte Reaction
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>P/S</b>	Estreptomina/ Penicilina
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PHA</b>	Fitohematoglutinina-A
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute

<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>Td</b>	Tiempo de duplicación
<b>TIMP-1</b>	Metalopeptidasa inhibidor 1
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Distribución geográfica de las especies de <i>Leishmania spp.</i> en el Perú</b> .....	5
<b>Figura 2. Respuesta espectral en la <i>Leishmania braziliensis.</i></b> .....	6
<b>Figura 3. Vias de inflamación en las úlceras de <i>L. braziliensis.</i></b> .....	8
<b>Figura 4. Principales propiedades de las CEM.</b> .....	10
<b>Figura 5. Metodologías de preestimulación para mejora la eficiencia terapéutica de las CEM.</b> .....	14
<b>Figura 6. Aislamiento y cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.</b> .....	22
<b>Figura 7. Esquema de caracterización de un cultivo de CEMh de gelatina de Wharton, en base a los estándares internacionales dados por la ISCT.</b> .....	25
<b>Figura 8. Obtención del antígeno soluble de <i>Leishmania braziliensis.</i></b> .....	29
<b>Figura 9. Pretratamiento de un cultivo de CEMh de gelatina de Wharton con ASL y LPS como control positivo.</b> .....	30
<b>Figura 10. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los secretomas pretratados con LPS y ASL.</b> .....	42
<b>Figura 11. Morfología del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton a través de los pases.</b> .....	43
<b>Figura 12. Cinética de proliferación del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.</b> .....	44
<b>Figura 13. Caracterización inmunofenotípica del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.</b> .....	45
<b>Figura 14. Evaluación de la capacidad de diferenciación del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.</b> .....	46

<b>Figura 15. Preestimulación del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton. ...</b>	<b>47</b>
<b>Figura 16. Cantidad de proteínas totales en los secretomas. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 17. Evaluación de la expresión de citoquinas en los secretomas. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 18. Cuantificación de factores inmunomoduladores en los secretomas.</b> <b>.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 19. Evaluación del efecto de los secretomas en poblaciones linfocitarias</b> <b>CD4+ y CD8+.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 20. Evaluación del efecto de los secretomas en subpoblaciones</b> <b>linfocitarias Th1, Treg, CD8+INF<math>\gamma</math>+ .....</b>	<b>55</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1. LEISHMANIASIS EN EL PERÚ</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.2. INMUNOLOGÍA DE LA <i>Leishmania braziliensis</i></b> .....	<b>5</b>
<b>2.1.3. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (CEM)</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1.4. SECRETOMA DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.5. PRETRATAMIENTO O ESTIMULACIÓN DE LAS CEMh</b> .	<b>13</b>
<b>2.1.6. CEM COMO TRATAMIENTO PARA LA LEISHMANIASIS</b>	<b>16</b>
<b>III. OBJETIVO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b> .....	<b>20</b>
<b>5.1. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	<b>20</b>
<b>5.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS</b> .....	<b>20</b>
<b>5.2.1. RECEPCIÓN Y TRASLADO DE LA MUESTRA DE CORDÓN UMBILICAL</b> .....	<b>20</b>

<b>5.2.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES HUMANAS (CEM<sub>h</sub>) DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2.3. CULTIVO DE CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2.4. CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2.5. DIFERENCIACIÓN IN VITRO DE CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2.6. OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE DE <i>Leishmania braziliensis</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.7. PRETRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS DE CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2.9. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2.10. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE IL-6 E IDO EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.11. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE IDO EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEM<sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....</b>	<b>36</b>

5.2.12. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE INOS EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEM <sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....	37
5.2.13. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOMODULADOR EN PBMCs .....	37
5.2.14. ANÁLISIS ESTADISTICO .....	42
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
6.1. CARACTERIZACIÓN DE UN CULTIVO DE CEM <sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....	43
6.2. PREESTIMULACIÓN DEL CULTIVO DE CEM <sub>h</sub> DE GELATINA DE WHARTON.....	47
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS SECRETOMAS.....	48
6.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA <i>in</i> <i>vitro</i> DEL SECRETOMA.....	53
6.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA <i>in</i> <i>vitro</i> DEL SECRETOMA.....	56
<b>VII.DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>VII.CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

La *Leishmania braziliensis* es la principal especie en el Perú que causa Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. La gravedad de sus úlceras se relaciona con una reacción inflamatoria exacerbada, por lo que terapias basadas en el secretoma de células estromales mesenquimales (CEM) podrían ser consideradas. El secretoma de las CEM presenta capacidad regenerativa e inmunomoduladora, la cual, incluso, puede ser potenciada cuando se exponen a diversos estímulos o pretratamientos. En este sentido, el objetivo del presente proyecto fue caracterizar el secretoma de las CEM humanas pretratadas con antígeno soluble de *L. braziliensis* y evaluar su potencial inmunomodulador. Se trabajó con CEMh de gelatina de Wharton las cuales fueron estabilizadas y caracterizadas según los estándares internacionales. En el paso 4 las células fueron pretratadas con antígeno soluble de *L. braziliensis* (ASL) y LPS como control positivo. Luego del pretratamiento el secretoma obtenido a las 72h fue caracterizado en su expresión de citoquinas, mediante un panel de quimioluminiscencia de 80 blancos, ensayos colorimétricos para medir IDO, IL-6 e iNOS/NO. Además, la capacidad inmunomoduladora fue evaluada en ensayos funcionales con PBMC humanos (n=3), midiendo por citometría de flujo el índice de proliferación linfocitaria y la presencia de poblaciones CD4+ y CD8+, así como subpoblaciones de linfocitos Treg y Th1. Los resultados mostraron un perfil antiinflamatorio a nivel de expresión de citoquinas para el pretratamiento con ASL y LPS. Ambos se caracterizaron por una menor expresión de citoquinas proinflamatorias IL-8, TNF $\alpha$  y GRO e incremento de IGFBP-4. Asimismo el LPS produjo un aumento significativo de iNOS y disminución de IL-6, mientras que ASL produjo una disminución

significativa de iNOS/NO e IDO . El ensayo funcional no evidenció un efecto antiproliferativo e inmunomodulador significativo para el ASL pero si tendencias a la disminución de las poblaciones proinflamatorias Th1 y CD8+INF $\gamma$ + asi como en el aumento de la relación de Treg/Th1. En conclusión el secretoma de las CEMh de gelatina de Wharton pretratadas con ASL presenta diferencias a nivel de expresión de citoquinas con una tendencia a un perfil antiinflamatorio, pero sin producir efectos significativos a nivel funcional en cultivos de PBMC de 3 voluntarios.

**Palabras clave:** *Leishmania braziliensis*, secretoma, células estromales mesenquimales, antígeno soluble, PBMCs

## ABSTRACT

*Leishmania braziliensis* is the main species in Peru that causes cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. The severity of their ulcers is related to an exacerbated inflammatory reaction, so therapies based on mesenchymal stem cell (MSC) could be considered. The MSC secretome has regenerative and immunomodulatory capacity, which can even be increased with the primed or pretreatment. The aim of the present project was to characterize the secretome of human MSC pretreated with soluble *L. braziliensis* antigen and to evaluate its immunomodulatory potential. We worked with a hMSC population derived from Wharton Jelly which was characterized according to international criteria. At passage 4, cells were pretreated with soluble *L. braziliensis* antigen and LPS as positive control. After priming the 72h secretome was characterized for its cytokine expression by a chemiluminescence panel of 80 targets and colorimetric assays to measure IDO, IL-6 and iNOS. Furthermore, the immunomodulatory capacity was evaluated in a functional assay with human PBMC (n=3), measuring by flow cytometry the proliferation index and the presence of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> populations, as well as subpopulations of Treg and Th1 lymphocytes. Results showed an anti-inflammatory profile at cytokine expression level for pretreatments with ASL and LPS. Both were characterized by a lower expression of proinflammatory cytokines IL-8, TNF $\alpha$  and GRO and increased IGFBP-4. Likewise, LPS produced a significant increase in iNOS and a decrease in IL-6, while ASL produced a significant decrease in iNOS/NO and IDO. The functional assay did not show a significant antiproliferative and immunomodulatory effect for ASL, but it did show trends towards a decrease in the proinflammatory Th1 and CD8<sup>+</sup>INF $\gamma$ <sup>+</sup>

populations, as well as an increase in the Treg/Th1 ratio. In conclusion, the secretome of Wharton's jelly hMSC pretreated with ASL shows differences in cytokine expression level with a tendency towards an anti-inflammatory profile, but without producing significant effects at the functional level in PBMC cultures from 3 volunteers.

**Keywords:** *Leishmania braziliensis*, secretome, mesenchymal stromal cells, soluble antigen, PBMCs

## I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria considerada un problema de salud pública, que en el Perú afecta principalmente a los trabajadores del campo de la sierra y selva del país. En 2020 se reportó 5056 casos de leishmaniasis, principalmente provocados por *Leishmania braziliensis* (CDC-MINSA, 2021; Kato et al., 2019). La infección por este parásito provoca una fuerte respuesta inflamatoria, llegando a causar casos graves de infecciones mucocutáneas y ulcerativas (Nylén & Eidsmo, 2012; Scott & Novais, 2016). Las úlceras frecuentemente aparecen en zonas visibles como en el rostro y brazos, dejando secuelas estéticas que pueden provocar alejamiento y posibles problemas psicológicos (Kevric et al., 2015). Actualmente, no se cuenta con una vacuna aprobada (Ikeogu et al., 2020) y los tratamientos disponibles que son suministrados por el Ministerio de Salud son muchas veces dolorosos, de larga duración, poco efectivos y con grandes efectos adversos. Para tres de los medicamentos más utilizados estudios clínicos han mostrado que el estibogluconato de sodio presentó 63% de eficacia (Franke et al., 1994), mientras que la pentamidina 35% y el antimonio de meglumina 78% (Andersen et al., 2005). Además, el tratamiento está destinado exclusivamente a la eliminación del parásito sin tomar en cuenta la parte inmunológica de la enfermedad y la curación estética de las heridas.

En ese sentido, es necesaria la búsqueda de un tratamiento indoloro y eficiente para la eliminación del parásito y la curación estética. Las Células Estromales Mesenquimales (CEM) han mostrado capacidad regenerativa, inmunomoduladora (Ha et al., 2020) y antimicrobiana (Alcayaga-Miranda et al.,

2017), lo que podría favorecer en simultáneo lo antes mencionado. Investigadores en Irán y Brasil han reportado resultados prometedores en modelos de ratón en el uso de las CEM derivadas de tejido adiposo de ratón en terapia combinada como tratamiento de leishmaniasis cutánea murina causada por *L. major* y *L. amazonensis*. En ambos casos se ha observado una disminución significativa en la carga parasitaria y el menor tiempo de cierre de la herida (Navard et al., 2020a; Ramos et al., 2020; Zanganeh et al., 2020). Mientras que para la especie *L. braziliensis*, la más predominante en el Perú, hasta el momento no existen investigaciones entorno al uso de estas células.

Por otro lado, la plasticidad de las CEM al enfrentarse a un estímulo, se ve reflejado en el cambio de los componentes de su secretoma, llegando a considerarse terapias dirigidas según el estímulo (Teixeira & Salgado, 2020). Hasta el momento solo existe un trabajo publicado sobre el secretoma de CEM de ratón estimuladas con antígeno soluble de *L. major*, el cual evaluó el potencial inmunomodulador en macrófagos de ratón *in vitro* dejando de lado la caracterización del secretoma (Khosrowpour et al., 2017). Tampoco se han reportado estudios utilizando CEM humanas (CEMh) estimuladas con antígeno soluble de *L. braziliensis*. Por lo que la presente tesis tuvo como objetivo caracterizar el secretoma de las CEMh de gelatina de Wharton pretratadas con antígeno soluble de *L. braziliensis* y evaluar su potencial inmunomodulador. En miras al desarrollo de una terapia celular dirigida hacia la enfermedad causada por *L. braziliensis*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1.1. LEISHMANIASIS EN EL PERÚ

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por un parásito del género *Leishmania spp.* y transmitida por la picadura del mosquito hembra del género *Lutzomyia* en América (OMS, 2022). En el Perú la leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida considerada un problema de salud pública y que afecta a más de 5000 personas cada año (CDC-MINSA, 2021), principalmente trabajadores del campo de la zona andina y selva del país. Siendo uno de los 10 países del mundo con mayor número de casos de leishmaniasis cutánea (OPS, 2022). Además, el 60% de los casos corresponde a los departamentos de Huánuco, Cusco, Madre de Dios, Cajamarca, Junín, Amazonas y San Martín (Samir et al., 2018).

Hasta la fecha en el país solo se ha reportado dos formas de la enfermedad: la cutánea y la mucocutánea (CDC-MINSA, 2021). En ambas las úlceras aparecen frecuentemente en zonas visibles como el rostro y brazos, por lo que el diagnóstico es esencial para limitar el progreso de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Siendo esto más apremiante para la forma mucocutánea ya que puede provocar desfiguración lo que conduciría al alejamiento social y problemas psicológicos.

El actual método de diagnóstico en el país se basa en pruebas de raspado cutáneo y cultivo para la observación de las formas amastigote y promastigote del parásito (MINSA, 2000). Sin embargo, estas pruebas no permiten la

identificación de especie por lo que el tratamiento establecido por el MINSA es el mismo, sin tomar en cuenta las grandes diferencias que existen a nivel de respuesta inmunológica según la especie de *Leishmania* (Scott & Novais, 2016) Las especies predominantes en el país son *L. braziliensis* (50%), *L. peruviana* (20%) y *L. guyanensis* (Kato et al., 2019; Tabbabi et al., 2020) (Figura 1), cuyo espectro varía entre una respuesta moderada de linfocitos Th1 a una fuerte respuesta proinflamatoria citotóxica con una baja carga parasitaria (L. F. Oliveira et al., 2011).

Hasta la fecha no existe una vacuna aprobada (Ikeogu et al., 2020) y desde hace décadas el tratamiento establecido por el MINSA se basa en antimoniales pentavalentes como tratamiento de primera línea: antimoniato N-metil-glucamina y estibogluconato de sodio con una dosis de 20mg/Kg de peso por 10 días administrado por vía endovenosa o intramuscular y Anfotericina B como tratamiento de segunda línea (MINSA, 2000). Este régimen de tratamiento es considerado doloroso, largo y poco efectivo sobretodo en niños y en infecciones por *L. braziliensis* (Franke et al., 1994; Llanos-Cuentas et al., 2008) teniendo además una gran cantidad de efectos secundarios desde fiebre y náuseas hasta daño hepático y renal (Masmoudi et al., 2005; L. F. Oliveira et al., 2011)

En este sentido investigadores alrededor del mundo han propuesto alternativas a estos medicamentos, menos tóxicas o que tomen en cuenta otros factores de la enfermedad, como la respuesta inmunológica del paciente y la regeneración de las heridas. Entre estas propuestas está el uso de la nanomedicina, terapias basadas en citoquinas, células dendríticas, productos

naturales en base a plantas y nuevos blancos moleculares (Dinc, 2022; Pradhan et al., 2022), así como el uso de células madre mesenquimales y sus derivados (Dameshghi et al., 2016; Khosrowpour et al., 2017).



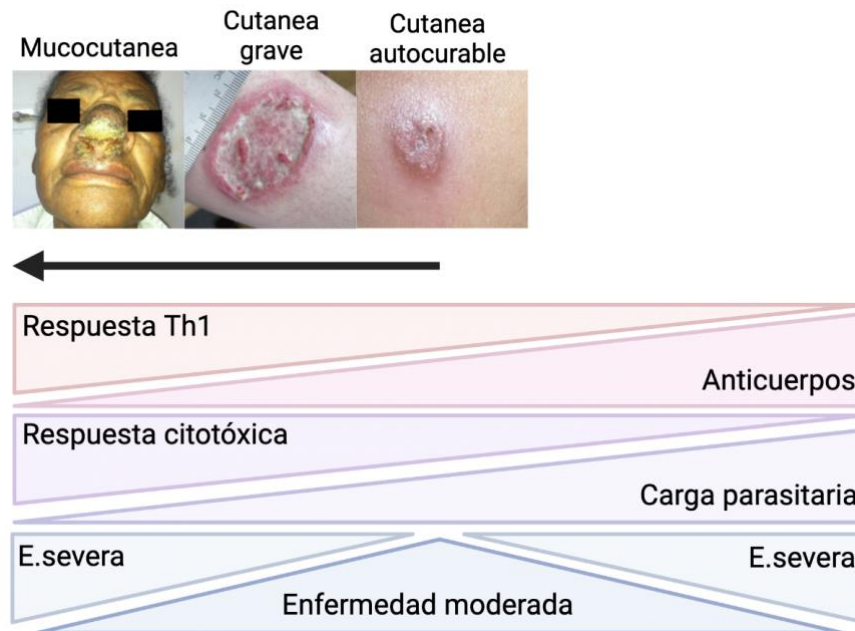
**Figura 1. Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* spp. en el Perú**

Recuperado de: (Kato et al., 2019)

### 2.1.2. INMUNOLOGÍA DE LA *Leishmania braziliensis*

La leishmaniasis es una enfermedad espectral donde factores como la especie del parásito y genética de la población definen la respuesta inmune que tendrá el paciente ante el parásito. Esta respuesta considerando todas las especies de leishmania puede variar desde ser antiinflamatoria con una alta tasa parasitaria en una leishmaniasis cutánea difusa a una fuerte respuesta proinflamatoria

con una baja tasa parasitaria en una leishmaniasis mucocutánea (Scott & Novais, 2016) Siendo ambos extremos del espectro perjudiciales para la recuperación ante la enfermedad (Figura 2).



**Figura 2. Respuesta espectral en la *Leishmania braziliensis*.** Se muestra las diferencias a nivel inmunológico entre una enfermedad moderada a una enfermedad severa. Adaptado de: (Scott & Novais, 2016). Elaborado en Biorender.com

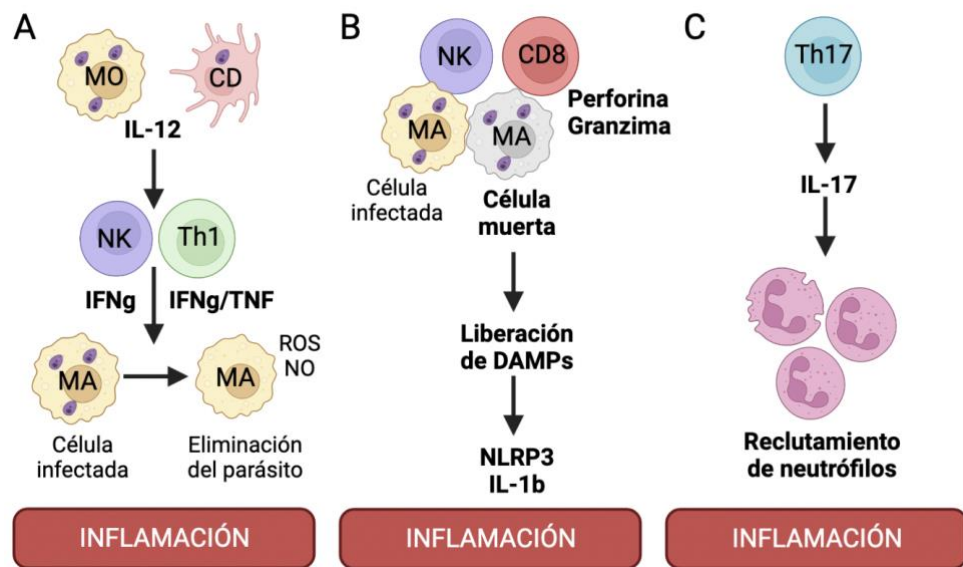
La especie *L. braziliensis* puede producir una leishmaniasis de tipo cutáneo como mucocutáneo. La leishmaniasis cutánea autocurable de *L. braziliensis* se caracteriza por una respuesta controlada de linfocitos Th1/Th2, mientras que cuando la gravedad aumenta se pierde el balance. La leishmaniasis mucocutánea es el tipo más grave de la enfermedad, sin curación espontánea y caracterizada por una fuerte respuesta inflamatoria con aumento de los linfocitos Th1, Th17, CD8+ citotóxicos, y neutrófilos (C. I. de Oliveira & Brodskyn, 2012)

La respuesta inmunológica del paciente en el caso de *Leishmania braziliensis* se desencadena a partir de los antígenos proteicos y lipídicos de la membrana del parásito, como el lipofosfoglicano (LPG) (Ibraim et al., 2013). Estos antígenos son reconocidos por los TLRs, principalmente los TLR2 y TLR4, de los macrófagos infectados o las células dendríticas (Carvalho et al., 2022). Dándose así la activación de la vía dependiente de MyD88 y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-12, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  y IL-17 (Polari et al., 2019). Estas a su vez contribuyen al reclutamiento de linfocitos Th1 y células NK que lideran la producción de INF $\gamma$ , la que en combinación con TNF $\alpha$  conducen a la activación de los macrófagos con la producción de ROS/NO para la eliminación del parásito. Sin embargo esta respuesta disminuye la carga parasitaria sin erradicarla y conduce a una respuesta inmunológica exacerbada contribuyendo a la patología de *L. braziliensis* (Figura 3A) (Carvalho et al., 2022).

Otras células reclutadas son los linfocitos T citotóxicos que en conjunto con las células NK participan en la eliminación de los macrófagos infectados mediante granzimas y perforinas. La liberación de los DAMPs asimismo conduce a la activación del inflamasoma NLRP3, liderando así la producción de IL-1 $\beta$  y una inflamación crónica. Finalmente los linfocitos Th17 reclutados conducen al llamado de los neutrófilos causantes principales del daño del tejido (Figura 3B,C) (Carvalho et al., 2022)

En resumen la fuerte respuesta inmunológica en casos graves de *Leishmaniasis braziliensis* es insuficiente para controlar la enfermedad a pesar de generar el aumento de la actividad de los macrófagos, linfocitos y

células NK. Esta respuesta en vez de ser protectora termina siendo perjudicial conduciendo a la patología del tejido y exacerbando el desarrollo de las úlceras, dejando cicatrices permanentes. Es así como tratamientos que modulen a la baja la respuesta inflamatoria serían necesarios para mejorar el control de la enfermedad.



**Figura 3. Vías de inflamación en las úlceras de *L. braziliensis*** A) Células dendríticas (CD) y monocitos (MO) infectados liberan IL-12 que promueve la diferenciación de los linfocitos Th1. Los Th1 y células NK liberan IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  que intervienen en la activación de los macrófagos, sin embargo están relacionados con la inflamación crónica y el desarrollo de la lesión B) Linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos y células NK mediante la liberación de perforinas y granzimas producen la lisis de macrófagos infectados con la liberación de patrones moleculares relacionados al daño (DAMPs). Estos a su vez activan al inflamasoma NLRP3 y la liberación de IL-1b C) Linfocitos Th17 producen la liberación de la IL-17 y el reclutamiento de neutrófilos aumentando la inflamación y el daño al tejido. Adaptado de: (Carvalho et al., 2022). Elaborado en Biorender.com.

### **2.1.3. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (CEM)**

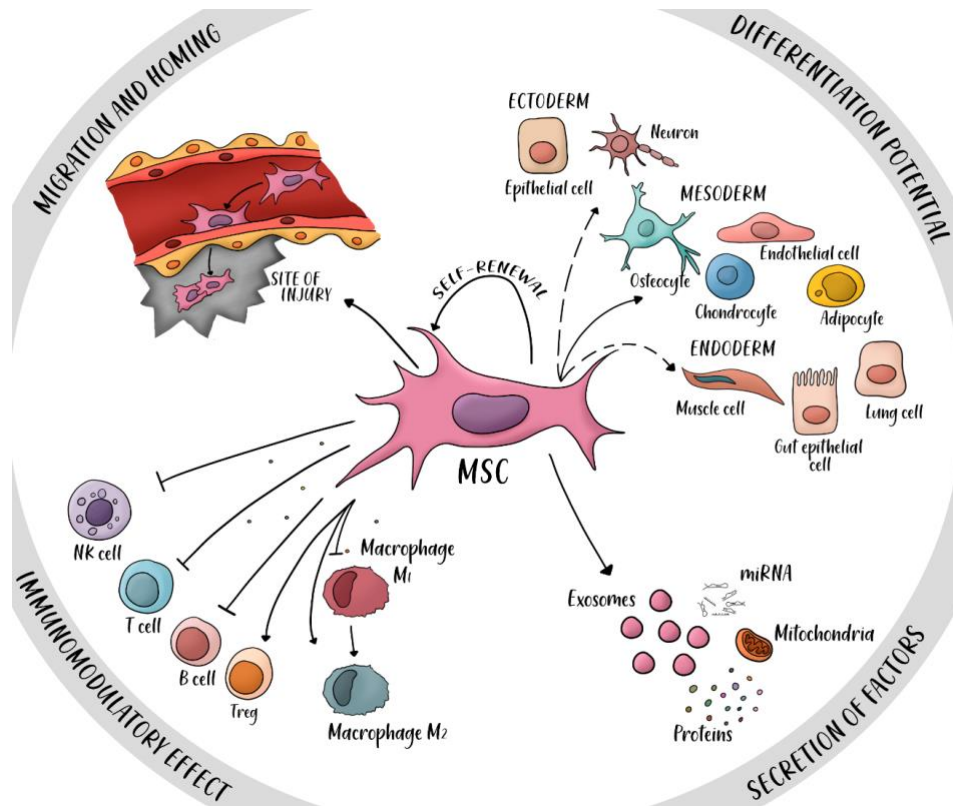
Las células estromales mesenquimales o células madre mesenquimales son un tipo de células madre adultas multipotentes que pueden ser derivadas a partir de diferentes tejidos como la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental, sangre fetal, la placenta, el cordón umbilical y la gelatina de Wharton (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).

Actualmente, Clinical Trial ([clinicaltrial.gov](http://clinicaltrial.gov)) menciona que la gelatina de Wharton es una de las principales fuentes de CEM en los ensayos clínicos, siendo una fuente de fácil acceso y no invasiva al ser un producto de desecho luego del parto. Además esta fuente se caracteriza por presentar bajos tiempos de duplicación y un gran potencial para el uso en medicina regenerativa (Kehl et al., 2019; Marino et al., 2019).

Las líneas celulares de diferentes fuentes deben compartir ciertas características para ser consideradas CEM. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios: 1) Capacidad de adherencia al plástico, 2) Potencial de diferenciación hacia osteoblasto, condroblasto y adipocito y 3) Presencia de marcadores del linaje mesenquimal CD73, CD90, CD105 y ausencia de marcadores de linaje hematopoyético CD34, CD45 y HLA-DR (Dominici et al., 2006).

Sumado a esto las CEM presentan cuatro propiedades principales que las hacen atractivas para su uso en el campo de la biomedicina. Estas son su potencial inmunomodulador, capacidad de diferenciación, capacidad de

migración u homing y la secreción de moléculas bioactivas (Figura 4) (Hosseini et al., 2018; Kim & Cho, 2013)



**Figura 4. Principales propiedades de las CEM.** 1) Potencial de diferenciación hacia: ectodermo, mesodermo y endodermo 2) Secreción de factores: miARN, proteínas, exosomas y mitocondrias 3) Potencial inmunomodulador 4) Migración y homing al sitio de la lesión. (Sanchez-Castro et al., 2021)

Actualmente las CEM humanas (CEMh) vienen siendo utilizadas en ensayos clínicos de manera alogénicas, por su baja inmunogenicidad. Su uso se ha reportado en enfermedades infecciosas, como el COVID-19 (Sánchez-Guijo et al., 2020), inflamatorias como la osteoartritis de rodilla y el pie diabetico (Cao et al., 2017) y degenerativas como la cardiopatía isquémica (Marino et al., 2019) Cabe resaltar que actualmente existen terapias celulares ya

comercializadas en base al uso de células madre mesenquimales (Levy et al., 2020)

En torno a los ensayos clínicos con CEMh de gelatina de Wharton, 32 ensayos han sido registrados en el [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), de los cuales 7 han sido completados. Entre las condiciones principales se encuentran el COVID-19, lesión de la médula espinal, úlceras crónicas, retinitis pigmentosa y osteoartritis de rodilla.

#### **2.1.4. SECRETOMA DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES**

El secretoma es el conjunto de proteínas solubles como citoquinas y factores de crecimiento, y una fracción vesicular compuesta de microvesículas y exosomas, que son liberadas por la células madre mesenquimales al medio exterior. Se conoce que las terapias libres de células como el secretoma tienen ciertas ventajas frente a las terapias celulares como 1) Menor tiempo y costo de cultivo, 2) Menor número de células requeridas para el tratamiento 3) Mayor producción 4) Facilidad para aplicaciones clínicas 5) Menor inmunogenicidad y 6) Fácil almacenamiento (Teixeira & Salgado, 2020). Esto sumado a que mantiene las propiedades inmunomoduladoras y regenerativas de las CEMh, la convierte en una propuesta atractiva para el uso en biomedicina.

Terapias a base de estos derivados han sido muy estudiadas los últimos años, por ejemplo el secretoma o medio condicionado de células madre mesenquimales de sangre menstrual ha sido utilizado con éxito en ensayos

clínicos de fase I y II para el tratamiento de casos severos de la COVID-19, demostrando que el tratamiento ayuda a revertir la hipoxia, la reconstitución inmune y controlar la tormenta de citoquinas (Fathi-Kazerooni et al., 2022)

ClinicalTrial (clinicaltrial.gov), hasta junio del 2022, informa 14 ensayos clínicos para secretoma de CEM, dos de ellos ya completados. En torno al secretoma de CEM de gelatina de Wharton se reporta un ensayo clínico terminado como tratamiento para úlceras crónicas en la piel mientras que otro se encuentra actualmente en reclutamiento el cual propone su uso en mujeres con ovario poliquístico como terapia para la infertilidad. Asimismo se encuentran en marcha un gran número de ensayos preclínicos proponiendo el uso del secretoma para enfermedades como Parkinson, artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, entre otras (Praveen et al., 2019)

Finalmente, la caracterización de los secretomas de células madre también ha presentado grandes avances. Se han reportado estudios proteómicos y metabolómicos del secretoma (Eleuteri & Fierabracci, 2019; Ivanova et al., 2016), además de análisis comparativos de secretomas de diferentes fuentes. Concluyendo por ejemplo que el secretoma de CEMh de gelatina de Wharton presenta un mayor potencial de inducir angiogenesis en relación a las fuentes de tejido adiposo y médula ósea (Kehl et al., 2019). Además que CEMh de la placenta y gelatina de Wharton presentan una mayor diversidad en su composición que las derivadas de tejidos adultos, aumentando su potencial terapéutico (Shin et al., 2021).

Asimismo, muchos más estudios han caracterizado las microvesículas del secretoma, estudiando su tamaño, expresión de marcadores, composición

proteica y de microARNs (Deng et al., 2018; Vallabhaneni et al., 2014). En general, estos estudios plantean la implicancia de la selección de la fuente del secretoma de CEMh dependiendo de la enfermedad donde busca ser aplicada.

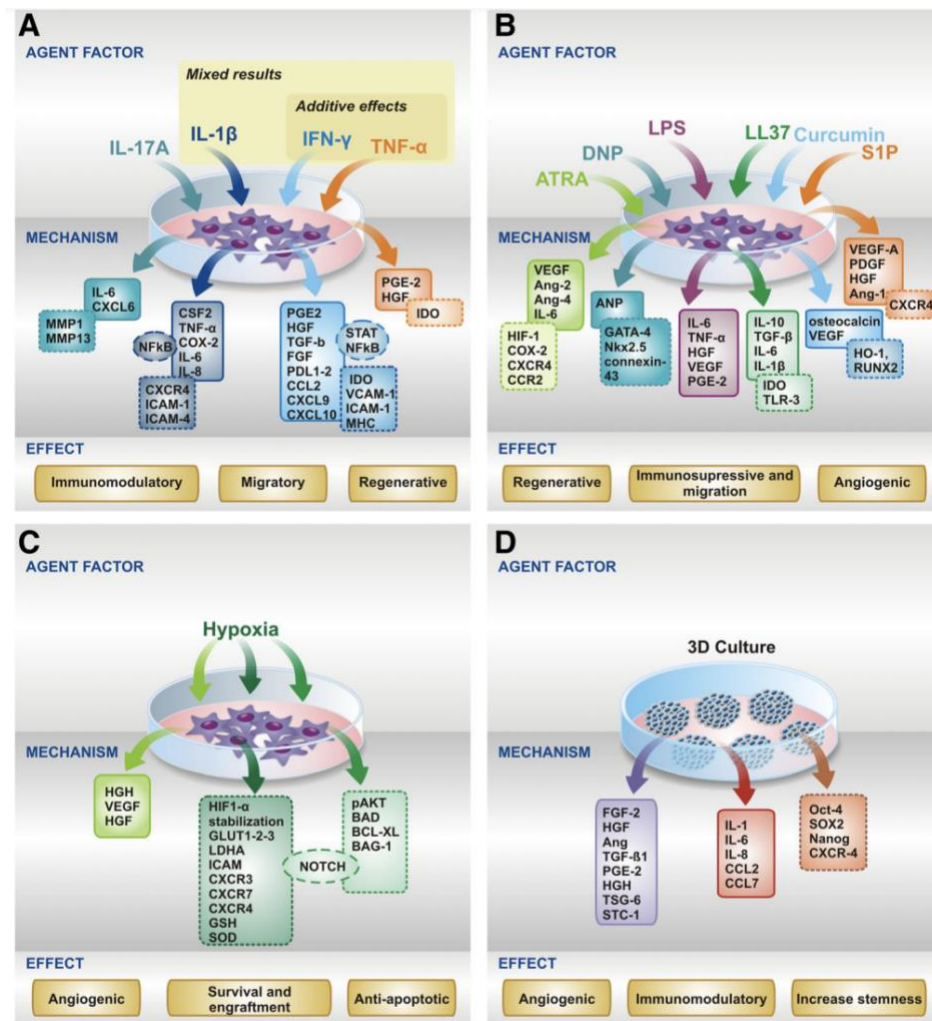
#### **2.1.5. PRETRATAMIENTO O ESTIMULACIÓN DE LAS CEMh**

La plasticidad de las CEM ante cualquier estímulo sugiere la propuesta de terapias dirigidas según el estímulo utilizado. Los últimos años se viene estudiando metodologías de estimulación o pretratamiento para potenciar las propiedades de las CEM e incrementar la eficiencia terapéutica (Noronha Nc et al., 2019).

El pretratamiento se define como la preparación de las células para alguna función específica. Hasta la fecha se ha planteado el uso de estímulos como citoquinas, factores de crecimiento, hipoxia, drogas farmacológicas, antígenos y diferentes condiciones de cultivo (Noronha Nc et al., 2019).

El pretratamiento con citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento se relaciona principalmente con el incremento de la función inmunosupresora de las células y el incremento de la secreción de factores antiinflamatorios e inmunomoduladores (Figura 5A) (Najar et al., 2018). La estimulación con  $INF\gamma$  de CEM de gelatina de Wharton ha reportado que incrementa la expresión de factores inmunosupresores como IDO y HLA-G5, quimioquinas como CXCL9 y CXCL10, así como proteínas de adhesión VCAM-1 y ICAM-1. Además estas células en ensayos funcionales mostraron propiedades antiinflamatorias con la disminución de la población Th17 (Q. Wang et al., 2016). Esta respuesta a nivel molecular se ha relacionado con la activación de

STAT1/STAT3 y la inhibición de la vía mTOR (Vigo et al., 2017). La estimulación con TNF $\alpha$  por su parte muestra resultados menos pronunciados pero en combinación con el INF $\gamma$  actúan de manera sinérgica aumentando las propiedades antiinflamatorias. Cabe resaltar que las principales desventajas del uso de estas citoquinas como estímulo son los altos costos y el incremento de la inmunogenicidad (Noronha Nc et al., 2019).



**Figura 5. Metodologías de preestimulación para mejora la eficiencia terapéutica de las CEM.** A) Estimulación con citoquinas y factores de crecimiento B) Estimulación con antígenos y agentes farmacológicos C) Estimulación con

hipoxia **D**) Estimulación con cultivos en tercera dimensión (3D) (Noronha Nc et al., 2019)

Condiciones de hipoxia han reportado el incrementando de su capacidad angiogénica y potencial regenerativo, como también la supervivencia en un tejido dañado (Figura 5C) (Lee & Joe, 2018). El uso de agentes farmacológicos como el VPA (ácido valproico) y ATRA (ácido retinóico) se ha relacionado con el incremento de la proliferación y actividad antiinflamatoria (Figura 5B) (Lim et al., 2017). Asimismo condiciones de cultivo en 3D que mimetizan mejor el microambiente tisular han reportado aumento de la potencia, capacidad inmunomoduladora y angiogénica (Figura 5D) (Noronha Nc et al., 2019).

En torno al uso de antígenos como estímulos, los estudios son aún mas recientes, para potenciar los mecanismos de defensa y protección celular. Se ha reportado el uso de Poly (I:C) y Lipopolisacarido de *Escherichia coli* (LPS), los cuales estan envueltos en infecciones virales y microbianas y son agonistas de los TLR3 y TLR4. Se conoce que la estimulación por Poly (I:C) lleva a un fenotipo de inmunosupresión mientras que el estimulación por LPS se ha reportado que lleva principalmente a un fenotipo proinflamatorio con la liberación de proteínas IL-6 y TNF $\alpha$ , asi como de factores regenerativos como HGF y VEGF (Figura 5B) (Waterman et al., 2010). Sin embargo se ha reportado que el perfil del pretratamiento por LPS esta muy ligado con el tiempo de estimulación, por ejemplo tiempos de estímulo menores a 12 horas dan un perfil mas proinflamatorio con aumento de IL-6 y disminución de iNOS, mientras que tiempos mayores a 24h dan un perfil mas antiinflamatorio con disminución de IL-6 y aumento de iNOS. En esta respuesta dual estaria implicada la activación de las vias independientes e dependientes de MyD88,

las cuales se activarían diferencialmente en el tiempo (Kurte et al., 2020). Asimismo se ha reportado que CEM murinas estimuladas con LPS y TNF $\alpha$  inducen a una polarización a macrófagos M2 y capacidad osteogénica (Lin et al., 2017).

Por otro lado el uso del antígeno soluble de leishmania de la especie *Leishmania major* como estímulo solo se ha reportado en CEM de ratón. En este estudio se muestra la polarización de los macrófagos a un fenotipo antiinflamatorio con la liberación de IL-10 y TNF $\alpha$ , así como bajos niveles de IL-6 (Khosrowpour et al., 2017).

#### **2.1.6. CEM COMO TRATAMIENTO PARA LA LEISHMANIASIS**

En los últimos años investigadores alrededor del mundo han propuesto el uso de células estromales mesenquimales como tratamiento para la leishmaniasis. El primer reporte en el 2016 es un ensayo *in vitro* con CEM de ratón derivadas de tejido adiposo, donde mencionan que macrófagos educados en cocultivos con CEM muestran una polarización mayor a un fenotipo M1-proinflamatorio en presencia de *L. major*. Proponiendo así a las CEMh como terapia para controlar la infección por *L. major* sobre todo en modelos susceptibles (Dameshghi et al., 2016). El año siguiente el mismo grupo iraní propuso el pretratamiento con antígeno soluble de *L. major* de las CEM de ratón, reportando que los macrófagos cocultivados con CEM pretratadas o su secretoma muestran un perfil M2- antiinflamatorio, aumentando el potencial fagocítico y controlando la respuesta inflamatoria, por lo que también resultó ser atractivo para el tratamiento de la enfermedad (Khosrowpour et al., 2017). En 2019 este grupo reportó el primer ensayo *in vivo* en un modelo de ratón

de *L. major* con resultados prometedores. CEM de raton derivadas de tejido adiposo fueron inyectadas en cuatro tiempos por via intravenosa. Pasados 90 dias de la infecci3n se report3 que el tratamiento con CEM reducía el tama1o de la lesi3n, la carga parasitaria y la diseminaci3n, sumado a esto se encontr3 que la respuesta de las CEM estaba muy ligada a los linfocitos Th1, pero que los niveles de IL-10 a1n permanecian altos (Zanganeh et al., 2020).

En 2020 otro grupo de investigadores iraní realiz3 un ensayo *in vivo* en un modelo de infecci3n con *L. major*, utilizando CEM de rat3n derivadas de m3dula 3sea. En este estudio los ratones fueron inyectados con CEM en combinaci3n o no con glucantime. Las heridas fueron evaluadas el dia 10, 20 y 30 días, encontrando que en el dia 30 las lesiones presentaban una regresi3n significativa en los ratones tratados con CEM y que la fagocitosis se veía aumentada, mientras que el tratamiento en combinaci3n disminuía la carga parasitaria. Confirmando así el promisorio uso de las CEM de diferentes fuentes como tratamiento de la leishmaniasis cutanea del viejo mundo por *L. major* (Navard et al., 2020a). Cabe resaltar que en 2021 otro estudio *in vivo* con CMM de tejido adiposo report3 tambien lo antes mencionado en torno al tratamiento con CEM pero no mostr3 asociaci3n del tratamiento en combinaci3n con glucantime y el incremento de la actividad antileishmania (Bahrami et al., 2021)

Por otro lado investigadores en Brazil en 2017 propusieron el uso de CEM de rat3n derivadas de m3dula 3sea en un modelo de rat3n de *L. amazonensis*. Ellos observaron que el n1mero de parásitos aumentaba con el tratamiento con CEM y la excesiva producci3n de IL-10. Por lo que concluyeron que el

tratamiento con CEM no ayudaba a controlar la enfermedad y contrariamente podría resultar en efectos deleterios (Pereira et al., 2017) . Sin embargo, años más tarde el mismo grupo reportó un nuevo ensayo *in vivo* con CEM de ratón derivadas de médula ósea y tejido adiposo en combinación con glucantime. En esta oportunidad observaron que el tratamiento combinado de glucantime con CEM de tejido adiposo reducía el tamaño de la lesión y la carga parasitaria por lo que el tratamiento combinado sería una alternativa viable para las úlceras de *L.amazonensis* (Ramos et al., 2020)

### **III. OBJETIVO**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial inmunomodulador *in vitro* del secretoma de las células estromales mesenquimales humanas pretratadas con antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislar y caracterizar células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton.
2. Caracterizar la expresión de citoquinas antiinflamatorias: IL-10, IDO y proinflamatorias: IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  del secretoma de CEMh pretratadas con antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*.
3. Evaluar *in vitro* la capacidad antiproliferativa del secretoma de CEMh pretratadas con antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* en poblaciones linfocitarias de cultivos PBMCs.
4. Evaluar *in vitro* el potencial inmunomodulador del secretoma de CEMh pretratadas con antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* en poblaciones linfocitarias de cultivos PBMCs.

### **IV. HIPÓTESIS**

El pretratamiento con antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* de las células estromales mesenquimales humanas de gelatina de Wharton aumenta las propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas del secretoma a nivel de expresión de citoquinas y en ensayos funcionales con PBMCs.

## **V. METODOLOGÍA**

### **5.1. DISEÑO METODOLÓGICO**

Se trata de un estudio de tipo experimental *in vitro*, realizado exclusivamente en laboratorio en condiciones de bioseguridad 2 en el Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza y en coordinación con el Hospital Regional Virgen de Fátima de Chachapoyas para la obtención de las muestras de cordón.

### **5.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

#### **5.2.1. RECEPCIÓN Y TRASLADO DE LA MUESTRA DE CORDÓN UMBILICAL**

La muestra de cordón umbilical fue obtenida previo consentimiento informado en el Hospital Regional Virgen de Fátima de Chachapoyas en condiciones de asepsia. Se trató de un parto por cesárea, de una madre sin enfermedades preexistentes (VIH, COVID-19 y sífilis), de edad entre 19-35 años, con edad gestacional mayor a 38 semanas y sin complicaciones en el embarazo y durante el parto.

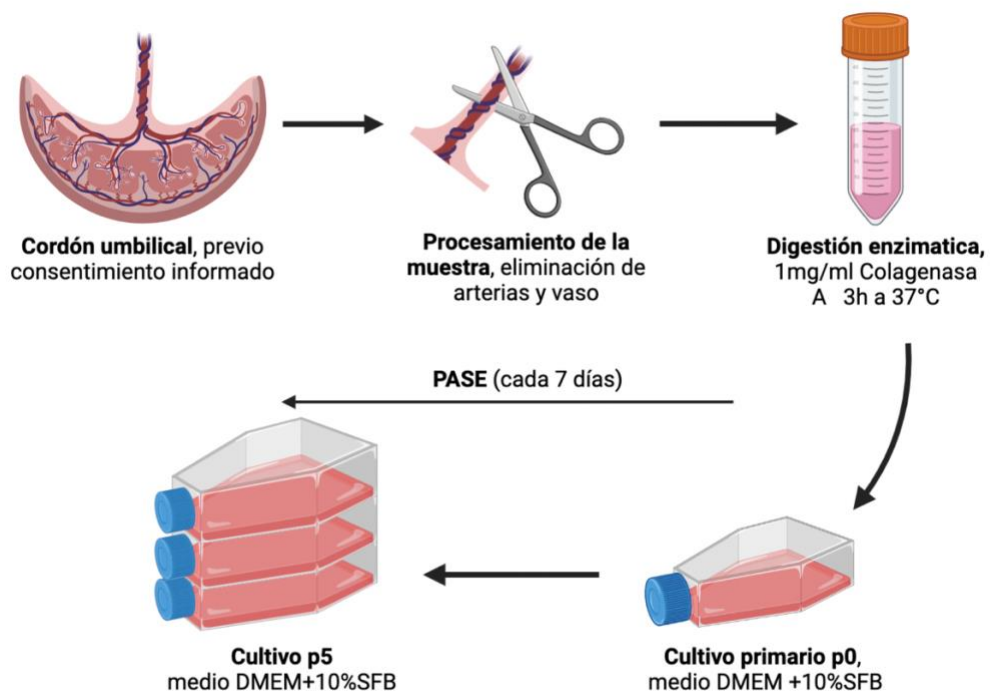
El traslado del cordón umbilical al laboratorio de bioseguridad 2 (BSL2) del Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (IET-UNTRM) se realizó en un plazo no mayor a 1 h y por empaque triple a temperatura ambiente (TA), siendo el primero un recipiente de plástico con suero fisiológico más antibióticos: 100 U/ml penicilina (Sigma, ref. P3032-25MG), 100 µg/ml estreptomina (Sigma, ref. S9137-25G) y 5µg/ml gentamicina (Gibco, ref.15750045), el

segundo una bolsa de bioseguridad y el tercero una caja térmica que incluyó el código de bioseguridad.

### **5.2.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES HUMANAS (CEMh) DE GELATINA DE WHARTON**

El cordón umbilical transportado al IET-UNTRM fue lavado 3 veces con DPBS (Gibco, ref. 21600-010) + antibióticos P/S: 100 U/ml penicilina (Sigma, ref. P3032-25MG) y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma, ref. S9137-25G), para eliminar la mayor cantidad de sangre. Con ayuda de una pinza y tijera se cortó los 20 cm de cordón en trozos de 4cm y se realizó 3 lavados con DPBS + antibioticos P/S. Con ayuda de pinzas y bisturí se eliminó la vena y las arterias de cada trozo. Posteriormente, se colocó todos los trozos en un tubo de 50ml y se volvió a realizar tres lavados con PBS+ antibióticos P/S.

Para el procesamiento enzimático los trozos se colocaron en un nuevo tubo de 50 ml con 15 ml de 1 mg/ml Colagenasa A (Roche Diagnostics GmbH, ref. 10103586001) en medio DMEM. Se incubó por 3 h a 37 °C en posición horizontal, con agitación suave cada 30 min. En un nuevo tubo se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 300 xg por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1ml de medio DMEM low glucose, Glutamax (Gibco, ref. 10567-014) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma, ref. 18C373 ) y antibióticos P/S. Finalmente, se cultivó en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, ref. 430641) con 7,5 ml del mismo medio. El frasco se matuvo en incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 6).



**Figura 6. Aislamiento y cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.** Elaborado en Biorender.com

### 5.2.3. CULTIVO DE CEMh DE GELATINA DE WHARTON

El cultivo primario de CEMh de gelatina de Wharton se expandió hasta el pase 5 en medio DMEM +10% SFB + P/S con cambios de medio cada 2 días y subcultivo cada 7 días (Figura 1). Para realizar el subcultivo cada frasco se lavó con DPBS (Gibco, ref. 21600-010) y posteriormente se trató con 3ml de tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, ref. 15400-054) a 37 °C por 3-4 min. La reacción se neutralizó con el mismo volumen de medio DMEM + 10% SFB + P/S y se centrifugó a 300 xg durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1ml de medio. En cada pase o subcultivo la células se sembraron a una concentración de 4000 células/cm<sup>2</sup> y se matuvo en incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

La concentración celular y el porcentaje de células viables se determinó mediante un hemocitómetro con Azul de Tripán (0,4%) (Sigma, ref. T6146-56) previo al sembrado. El seguimiento de la cinética de proliferación se expresó mediante el cálculo del tiempo de duplicación (Td) y el doblaje acumulativo poblacional (DAP) mediante las siguientes fórmulas:

$$Td = \frac{t * \text{Log}(2)}{\text{Log}([\ ]_{final}) - \text{Log}([\ ]_{inicial})}, \text{ t=tiempo (h), [ ]= concentración celular (células/ul)}$$

$$DAP = \frac{\text{Log}([\ ]_{final}) - \text{Log}([\ ]_{inicial})}{\text{Log}(2)}, \text{ [ ]= concentración celular (células/ul)}$$

Un banco de células fue creado al finalizar el pase 2 con el fin de realizar experimentos independientes. Se congeló en crioviales, 1 millón de células por 500ul de medio de cultivo con 10% de DMSO. El congelamiento fue paulativo a 1 °C/min en un recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Fisher, ref. 5100-0036) llenos con isopropanol donde se dejó por toda una noche a -80 °C, para luego ser colocados en sus respectivas criocajas.

#### **5.2.4. CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Los marcadores de membrana positivos: CD73, CD90, CD105, CD29, CD166, CD44 y negativos: CD34, CD45, CD31, HLA-DR para CEMh se evaluaron en tres pases consecutivos (pase 3 al 5) (Figura 7).

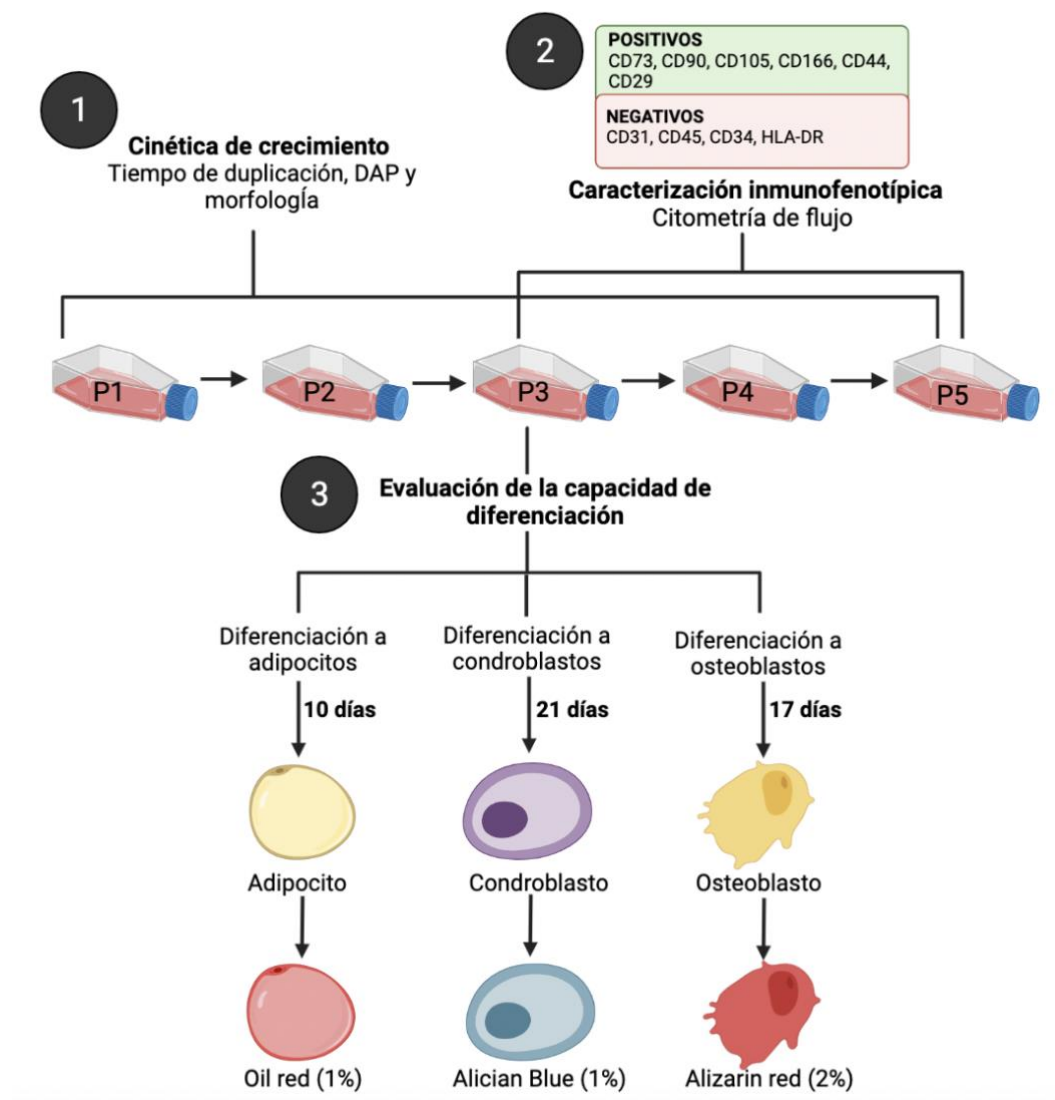
En cada pase 1 millón de las células recuperadas se resuspendieron en 1ml de solución de bloqueo: 0,3 M de L-glicina (Merck, ref. A3741) y 5% de SFB en DPBS. Se utilizó 50 000 células por cada marcador por lo que se alicuotó

50 µl en 14 tubos de 1.5 ml. En cada tubo se agregó 1µl del anticuerpo respectivo (1:50): anti-human CD90-FITC (BD, ref. 555595), anti-human CD73-PE (BD, ref. 550257), anti-human CD105-PE (BD, ref. 560839), anti-human CD29-PE (BD, ref. 555443), anti-human CD166-PE (BD, ref. 559263), anti-human CD44-FITC (BD, ref. 347943), anti-human CD34-PE (BD, ref. 555822), anti-human CD45-FITC (BD, ref. 345808), anti-human HLA-DR-FITC (BD, ref. 555558), anti-human CD31-FITC (BD, ref. 555445); o 1µl del control de isotipo (1:50): control de isotipo FITC IgG1, k (BD, ref. 555748), control de isotipo FITC IgG2, k (BD, 555573), control de isotipo PE IgG1, k (BD, 555749). El tubo sobrante se consideró como control negativo o blanco. Se incubaron los tubos en oscuridad por 30 min a TA y se agregó 1ml de DPBS (Gibco, ref. 21600-010). Se centrifugó a 300g durante 5min y se eliminó el sobrenadante. Las células marcadas se resuspendieron en 200µl de DPBS y se colocaron en una placa de 96 pocillos para su lectura en el citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter).

El control negativo o blanco fue utilizado para identificar la población y establecer los parámetros de voltaje, mientras que los controles de isotipo se utilizaron para definir el umbral de positividad en el histograma, dejando un 0,2% de células positivas. Para el análisis y presentación final de los datos se utilizó el programa FlowJo v10.7.2 (BD).

### 5.2.5. DIFERENCIACIÓN IN VITRO DE CEMh DE GELATINA DE WHARTON

Al final del pase 3, las CEMh de gelatina de Wharton fueron cultivadas en medios de diferenciación específicos hacia condroblasto, adipocito y osteoblasto.



**Figura 7. Esquema de caracterización de un cultivo de CEMh de gelatina de Wharton, en base a los estándares internacionales dados por la ISCT. 1) Evaluación de la cinética de crecimiento y morfología a través de los pases 2) Caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo en tres pases consecutivos:**

pase 3 al pase 5 **3**) Evaluación de la capacidad de diferenciación hacia adipocito, condroblasto y osteoblasto en el pase 3. ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular. Elaborado en Biorender.com

### **Diferenciación hacia condroblasto**

En una placa de 6 pocillos se sembró una gota de 50 µl con 10 000 células/µl. La gota fue incubada por 2 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo se observó la formación de una micromasa y se agregó 1 ml de medio de diferenciación hacia condroblasto: StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, StemPro Chondrogenesis Supplement (Gibco, ref. A1007101) y 5 ug/ml gentamicina (Gibco, ref.15750045). Se continuó el cultivo en las condiciones ya mencionadas durante 21 días, realizando cambio de medio cada 72 h. La diferenciación fue realizada por triplicado considerando pocillos control y de diferenciación.

Para la tinción de las células diferenciadas a condroblasto, se eliminó cuidadosamente el medio de diferenciación y se lavó 3 veces con 1 ml de DPBS. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente (TA). con 1 ml de paraformaldehído (Sigma, ref. 818715) al 4% en agua y se volvió a lavar 3 veces con 1 ml de DPBS. Inmediatamente se incubó por 1 h a TA con 1 ml de Alcian Blue (Sigma, ref. 109-09) al 1% en 0.1 N HCl. Se lavó 3 veces con 1ml de 0.1 N HCl y una vez con agua destilada. Finalmente, la micromasa fue observada en un microscopio invertido y fotografiada (Figura 7).

### **Diferenciación hacia adipocitos**

En una placa de 6 pocillos se sembró las células a una concentración de 5 000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivó en medio DMEM + 10% SFB + P/S durante tres días a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo el medio fue remplazado por 1ml de medio de diferenciación hacia adipocitos: StemPro Adipocyte Differentiation Basal Medium, StemPro Adipocgenesis Supplement (Gibco, ref. A1007001) y 5 µg/ml gentamicina (Gibco, ref.15750045). Se continuó el cultivo en las condiciones ya mencionadas durante 10 días, hasta observar vacuolas lipídicas, realizando cambio de medio cada 72 h. La diferenciación fue realizada por triplicado considerando pocillos control y de diferenciación.

Para la tinción de las células diferenciadas a adipocitos, se eliminó cuidadosamente el medio de diferenciación y se lavó 3 veces con 1 ml de DPBS. Se incubó por 30 min a TA con 1 ml de paraformaldehido (Sigma, ref. 818715) al 4% en agua y se volvió a lavar 3 veces con 1ml de DPBS. Se incubó por 5min con 1ml de isopropanol (Sigma, ref. I9516) al 60% y posteriormente 15 min con 1 ml de Oil red (Sigma, ref. O0625) 1% en isopropanol. Se lavó 3 veces con 1 ml de DPBS. Finalmente, las células fueron observadas en un microscopio invertido y fotografiadas (Figura 7).

### **Diferenciación hacia osteoblastos**

En una placa de 6 pocillos se sembró las células a una concentración de 5 000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivó en medio DMEM + 10% SFB durante tres días a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo el medio fue remplazado por 1 ml de medio de diferenciación hacia osteoblastos: StemPro Osteocyte/Chondrocyte

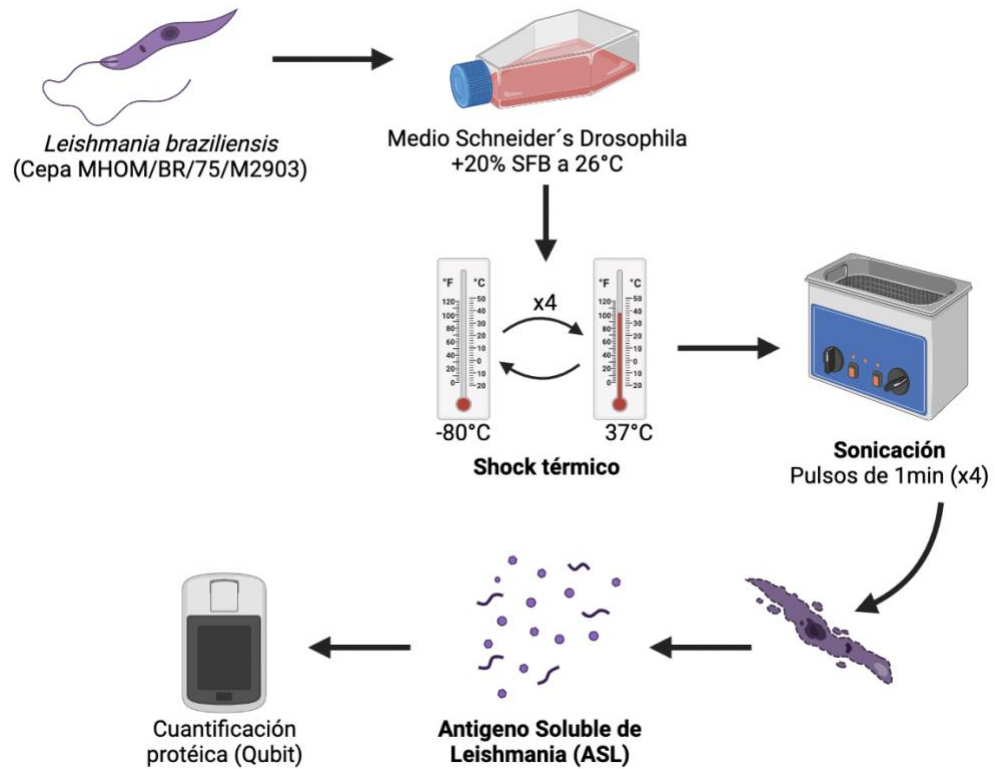
Differentiation Basal Medium, StemPro Osteogenesis Supplement (Gibco, ref. A1007201) y 5 µg/ml gentamicina (Gibco, ref.15750045). Se continuó el cultivo en las condiciones ya mencionadas durante 17 días, hasta observar depósitos de calcio, realizando cambio de medio cada 72 h. La diferenciación fue realizada por triplicado considerando pocillos control y de diferenciación. Para la tinción de las células diferenciadas a osteoblastos, se eliminó cuidadosamente el medio de diferenciación y se lavó 3 veces con 1 ml de DPBS. Se incubó por 30 min a TA con 1 ml de paraformaldehído (Sigma, ref. 818715) al 4% en agua y se volvió a lavar 3 veces con 1 ml de DPBS. Se incubó por toda una noche con 1 ml de Alizarin Red S (Sigma, ref. TMS-008) al 2% en PBS pH 4.1- 4.3. Se lavó 3 veces con 1 ml de DPBS. Finalmente, las células fueron observadas en un microscopio invertido y fotografiadas (Figura 7).

#### **5.2.6. OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE DE *Leishmania braziliensis***

La línea ATCC de promastigotes de *Leishmania braziliensis* (Cepa MHOM/BR/75/M2903) donada por el laboratorio NAMRU-6 “Naval Medical Research Unit” fue estabilizada en medio Schneider’s *Drosophila* suplementado con SFB al 20%. El cultivo se mantuvo a 26 °C realizando subcultivos cada 4 días.

Para la obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL), los cultivos se centrifugaron a 1000 xg por 10 min a 4 °C y se lavaron con 1 ml de PBS estéril frío. Se volvió a centrifugar a 1000 xg por 10 min a 4 °C y se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis: 50 mM Tris-HCl (Sigma,

ref.PHG0002) + 5 mM EDTA(Sigma, ref. 324506) en pH 7.1. Se realizó 4 ciclos de congelamiento (-80 °C por 20min) / descongelamiento (37 °C). Posteriormente se realizó 4 ciclos de sonicación con pulsos de 1 min en el Baño Ultrasonificador (Biobase) y se centrifugó a 5000 xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -80 ° C hasta su uso. La cantidad de proteínas se determinó con el Qubit™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher, ref.Q33211) en un Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher) utilizando 2 ul de la muestra (Figura 8).



**Figura 8. Obtención del antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*.** Elaborado en Biorender.com

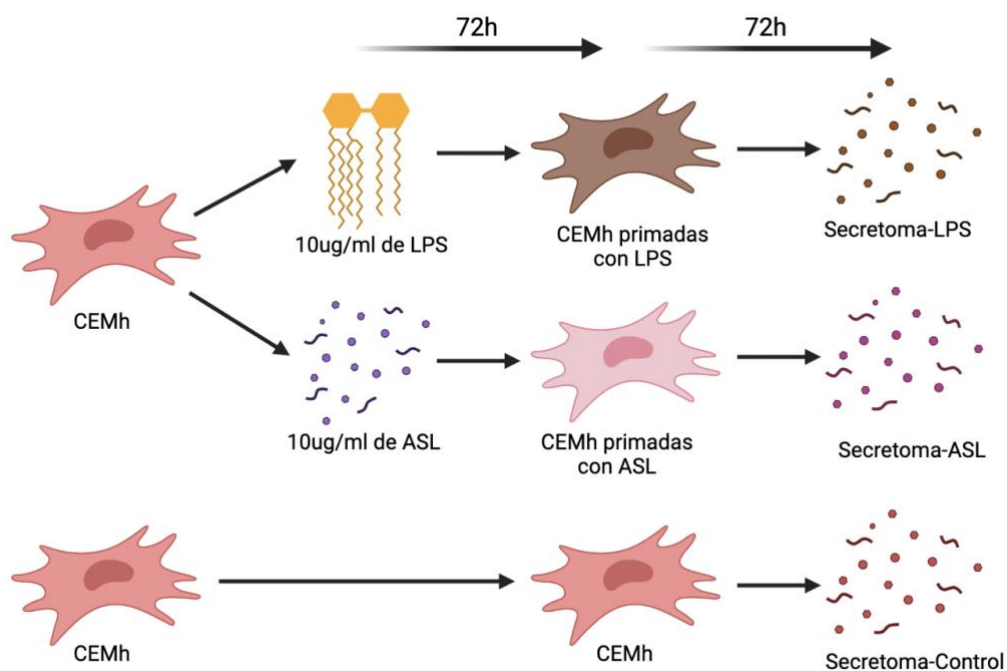
### 5.2.7. PRETRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS DE CEMh DE GELATINA DE WHARTON

Células del pase 4 fueron sembradas en 3 frascos de 25 cm<sup>2</sup> a 4000 células/cm<sup>2</sup>. Las CEMh se cultivaron por 72 h con 5 ml de medio DMEM + 10% SFB + P/S para estabilizar el cultivo. Posteriormente se eliminó el medio y se estimuló por 72 h con 5 ml de las siguientes condiciones preparadas en medio de cultivo:

Frasco 1: 10 ug/ml de LPS (Sigma, ref. L2880) (Control positivo)

Frasco 2: 10 ug/ml de antígeno soluble de leishmania (ASL)

Frasco 3: Sin pretratamiento (Control negativo)



**Figura 9. Pretratamiento de un cultivo de CEMh de gelatina de Wharton con ASL y LPS como control positivo.** ASL: Antígeno soluble de Leishmania, CEM: Células Estromales Mesenquimales. Elaborado en Biorender.com

Luego de las 72 h, las células fueron lavadas tres veces con 5 ml de DPBS para eliminar restos del estímulo e inmediatamente se les agregó 5 ml de

medio DMEM + P/S y se mantuvo en incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los secretomas se recolectaron a las 72 h en tubos de 15 ml y se pasaron por filtros de 0.22 µm (Millipore, Budapest, Hungría) para remover restos celulares. Los pretratamientos fueron realizados en tres experimentos independientes (Figura 9).

Por cada secretoma se separó 5 alicuotas de 1ml en tubos de 5 ml. Dos alicuotas fueron almacenadas a -80 °C para la caracterización protéica, mientras que tres fueron liofilizadas para su transporte y uso en los ensayos funcionales. La liofilización fue realizada por 24h en el sistema al vacío FreeZone 4.5 Liter (Labconco), a una temperatura de -84°C y una presión entre 0.007 mBar hasta 0.018 mBar. Además como control de calidad del laboratorio se realizó la cuantificación de IL-6 mediante el kit de ELISA “DuoSet ELISA human IL-6” (RyD, ref. DY206-05) antes y después de la liofilización. Finalmente para su uso fueron reconstituidos en 1ml de agua Milli-Q pH 7.2.

#### **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEMh DE GELATINA DE WHARTON**

La cuantificación de proteínas totales de los secretomas de las CEMh se realizó con el Qubit™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher, ref.Q33211) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se mezcló 20 ul de cada secretoma con 180 ul del mix de los reactivos proporcionados por el kit y se incubó por 15 min a TA. La cuantificación se realizó en el Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher).

La cantidad de proteínas fue expresada en ug de proteína/ml y ug de proteína/mil células, tomando como referencia el número de células en el momento de la recolección del secretoma.

#### **5.2.8. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEMh DE GELATINA DE WHARTON**

La expresión de citoquinas en los secretomas fue evaluada mediante un panel de anticuerpos prediseñado Human Cytokine Antibody Array (Membrane, 80 Targets) (ab133998, Abcam). Este panel contiene anticuerpos contra las 80 citoquinas humanas: ENA-78, GCSF, GM-CSF, GRO, GRO-alfa, I-309, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40 / p70, IL-13, IL-15, IFN-gamma, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCSF, MDC, MIG, MIP-1beta, MIP-1delta, RANTES, SCF, SDF-1, TARC, TGF-beta1, TNF-alfa, TNF-beta, EGF, IGF-I, angiogenina, oncostatina M, trombopoyetina, VEGF-A, PDGF-BB, Leptina, BDNF, BLC, Ckβ8-1, Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-9, Ligando Flt-3, Fractalquina, GCP-2, GDNF, HGF , IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IL-16, IP-10, LIF, LUZ, MCP-4, MIF, MIP-3 alfa, NAP-2, NT-3, NT- 4, osteopontina, osteoprotegerina, PARC, PLGF, TGF-beta2, TGF-beta3, TIMP-1, TIMP-2.

Se siguió las indicaciones del fabricante. Para el bloqueo de las membranas estas fueron colocadas en una placa de 8 pocillos con el lado impreso hacia arriba e incubadas con 2 ml de Buffer de Bloqueo 1X a TA por 30 min en rotación 1ciclo/seg. Posteriormente se eliminó el buffer sin perturbar la

membrana y se agregó 1 ml del secretoma a evaluar, el cual se incubó overnight a 4 °C en movimiento. Se eliminó los secretomas y se realizó 3 lavados con 2 ml de Buffer de Lavado I (1X) incubando por 5 min a TA, seguidamente se realizó 2 lavados con 2 ml de Buffer de Lavado II (1X) incubando también por 5 min a TA. A continuación se eliminó todo el buffer y se incubó por 2 h a TA con 1 ml de Biotin-Conjugated Anti-Cytokines (1X). Se repitió el ciclo de lavados ya mencionado y se incubó por 2 h a TA con HRP- Conjugated Streptavidin (1X). Se volvió a hacer el ciclo de lavados mencionado y para la detección por quimioluminiscencia se transfirió la membrana primero sobre un papel toalla para secar los restos de cualquier buffer y luego sobre una hoja plástica. A continuación se agregó lentamente desde los costados de la membrana 500 ul del mix de Buffer de Detección: Detection Buffer C y Detection Buffer D (1:1) y se incubó por 2 min a TA. Inmediatamente se cubrió desde los costados sin generar burbujas con otra hoja de plástico.

Para la lectura se utilizó el equipo de quimioluminiscencia GeneGenome XRQ (SynGene) con el protocolo preestablecido por el sistema “Chemiluminiscent blot Series 5x1 min” con exposición de 30s. Los valores de densitometría (densidad de señal por unidad de área) fueron obtenidos en el software del equipo y exportados en formato Excel. En primer lugar se realizó una corrección de fondo, restando el promedio de los 4 controles negativos a cada citoquina del panel. Seguidamente se normalizó los arrays usando como referencia el array de medio DMEM y se calculó la intensidad

de la señal normalizada de cada citoquina del panel mediante la siguiente fórmula:

$$X(Ny) = X(y) * P1/P(y)$$

Donde:

P1= media de densidad de señal de los controles positivos en el array de referencia

P(y)= media de densidad de señal de los controles positivos en el array “y”

X(y)= media de densidad de señal de la citoquina X en el array “y”

X(Ny)= intensidad de señal normalizada de la citoquina X en el array “y”

Finalmente a los valores de intensidad de señal normalizada de cada citoquina en cada tratamiento se les restó los valores obtenidos en el array del medio DMEM. El logaritmo en base 10 de los valores de intensidad resultantes fueron presentados en un mapa de calor elaborado en el programa GraphPad Prism. Asimismo se calculó los valores de expresión relativa dividiendo la intensidad obtenida en los secretomas pretratados con LPS y ASL entre el secretoma sin pretratamiento. Se utilizó el logaritmo en base 2 para representar los cambios más resaltantes.

#### **5.2.9. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE IL-6 E IDO EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEMh DE GELATINA DE WHARTON**

La expresión cuantitativa de IL-6 e IDO en los secretomas fue evaluada mediante los ensayos de ELISA “DuoSet ELISA human IL-6” (RyD, ref.

DY206-05) y el “DuoSet ELISA human IDO” (RyD, ref. DY6030-05). Para la preparación de las placas se diluyó el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo de 2 ug/ml en PBS pH 7.2-7.4. Seguidamente se cubrió los pocillos de la placa de 96 de fondo plano con 50 ul del anticuerpo y se incubó toda la noche a temperatura ambiente (TA). A continuación se eliminó el sobrenadante y se realizó 3 lavados con 350 ul del buffer de lavado: 0.05% Tween 20 (OmniPur, ref.9480) en PBS pH 7.2-7.4, eliminando el líquido invirtiendo la placa y con golpes sobre papel. La placa fue bloqueada agregando 300 ul del Reactivo de Dilución: 1% BSA (Sigma, ref. A9418) en PBS pH 7.2-7.4 e incubando a TA por 1 h. Posteriormente se repitió el ciclo de lavado ya mencionado y se agregó 50 ul del secretoma a evaluar o del estándar para una incubación de 2 h a T.A. Se repitió el ciclo de lavado y se agregó 50 ul del anticuerpo de detección a una concentración de trabajo de 50 ng/ml para IL-6 y de 500 ng/ml para IDO preparado en el Reactivo de Dilución. La placa se incubó por 2 h a TA y se repitió el ciclo de lavado. Se agregó 50 ul de Estreptavidina-HRP 1X a cada pocillo y se incubó por 20 min a TA protegido de la luz. Se repitió el ciclo de lavados y se agregó 100 ul de la Solución de Sustrato: 1-Step Ultra ELISA (ThermoFisher, ref.34028). La incubación se realizó por aproximadamente 20 min y se detuvo con 50 ul de la Solución Stop: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La densidad óptica se determinó usando el lector de microplacas BIOBASE-EL10A ELISA (Biobase) a 450nm y con una longitud de onda de corrección de 570nm. La curva estándar para IL-6 correspondió a 7 puntos con valores entre 600-9.38 pg/ml, mientras que la

curva de IDO correspondió a valores entre 30-0.469ng/ml (Anexo 1). Las muestras y estándares fueron evaluadas por duplicado.

#### **5.2.10. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE IDO EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEMh DE GELATINA DE WHARTON**

La expresión cuantitativa de la actividad de IDO en los secretomas fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico basado en la solución de Ehrlich que mide la cantidad de L-kinurenina en el medio. En tubos de 1.5 ml se alicuotó 160 ul del secretoma a evaluar o del estándar y se agregó 10 ul de ácido tricloroacético (J.T.Baker, ref.J48725) al 30% (diluido en agua) (TCA 100%=6.1N). Se homogenizó por pipeteo y se incubo por 30 min a 50 °C en un termobloque para hidrolizar N-formilkinurenina en kinurenina. Seguidamente se centrifugó a 2000 RPM a TA y se transfirió 100 ul del sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo plano. En cada pocillo se agregó 100 ul de solución de Ehrlich (Sigma, ref. 1.03058) a 12 mg/ml diluido en ácido acético (Merck, ref. K38162363). Inmediatamente se realizó la lectura de la absorbancia en el lector de microplacas BIOBASE-EL10A ELISA (Biobase) a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda referencia de 570 nm. L-kinurenina fue utilizado como control positivo para establecer la curva estándar con valores de 200 uM a 12,5 uM. La actividad de IDO fue calculada en base a esta curva.

### **5.2.11. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE iNOS EN LOS SECRETOMAS DE LAS CEMh DE GELATINA DE WHARTON**

La evaluación cuantitativa de la actividad de iNOS en los secretomas fue mediante la reacción de Griess, que mide la cantidad de nitritos y nitratos en el medio. El reactivo de Griess (Sigma, ref. G4410-106) fue preparado en agua destilada a una concentración de 40ug/ul. En una placa de 96 pocillos de fondo plano se agregó 50ul del secretoma a evaluar o del estándar y 50ul del reactivo de Griess. Seguidamente se incubó por 5min a TA en oscuridad y en movimiento. La lectura de la absorbancia se realizó en el lector de microplacas BIOBASE-EL10A ELISA (Biobase) a una longitud de onda de 550nm y una longitud de onda referencia de 590nm. La molécula NaNO<sub>2</sub> (Sigma, ref. 237213-1006) fue utilizada como control positivo para establecer la curva estándar con valores de 500uM a 0.9uM en medio DMEM (Anexo 1). La actividad de iNOS fue calculada en base a esta curva.

### **5.2.12. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOMODULADOR EN PBMCs**

#### **Aislamiento de PBMCs de sangre periférica**

El ensayo funcional fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular de la Universidad de los Andes, Chile. Previo consentimiento informado sangre total fue colectada de 3 voluntarios sanos entre 18-40 años sin enfermedades preexistentes y con hemograma completo con valores normales. La sangre fue colectada mediante venopunción en tubos BD Vacutainer Sodium Heparin (BD, ref.36784) de 10 ml. La sangre de cada

individuo fue procesada independientemente. La sangre fue diluida 1:2 en un tubo de 50 ml con 20 ml de PBS estéril pH. 7.2 y se homogenizó por inversión evitando la generación de burbujas. Posteriormente la sangre diluida fue colocada lentamente sobre 10 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, 17-1440-03), colocando el tubo a una inclinación de 15 grados para evitar que se mezclen las fases. Se centrifugó a 2000 RPM a 22°C por 30 min con aceleración 1 y desaceleración 0. A continuación se recuperó el anillo de células mononucleares y se realizó 2 lavados con PBS centrifugando a las células a 1800 RPM por 10 min con aceleración 9 y desaceleración 9. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 2 ml de PBS. Inmediatamente las células fueron cuantificadas con una dilución de 1:20 ul con Azul de Tripan en un hemocitómetro (Figura 5).

#### **Tinción con CTV “Cell Trace Violet stain”**

La tinción para 10-20 millones de PBMC de cada voluntario se realizó utilizando una dilución 1:2000, para la cual se agregó 1 ul de CTV “Cell Trace Violet stain” (Invitrogen, ref. C34557A) a los 2 ml de suspensión de PBMC. Se homogenizó suavemente por inversión y se incubó por 20 min a 37 °C. Seguidamente se bloqueo la reacción agregando 1 ml de SFB y 4 ml de PBS y se centrifugó a 1600 RPM por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de “Mixed lymphocyte reaction”(MLR): IMDM (Gibco, ref. 12440-053), 15% de SFB (Corning, ref. 35-076-CV), Penicilina/Estreptomicina (Corning,ref. 30002358), 2 mM Glutamina (Corning, ref.08320010), 20 mM Hepes (Cytiva, ref. SH30851.01), 50 uM beta-mercaptoetanol (Gibco, 31350-010) y aminoácidos no esenciales

(Gibco, 11140-50). Finalmente se realizó un recuento de las células con Azul de Tripán en la cámara de Neubauer.

### **Ensayo de linfoproliferación**

En base a la última concentración encontrada los PBMC de cada voluntario fueron llevados a una concentración de 4000 células/ul en medio MLR. Luego en un placa de 96 pocillos de fondo U (Corning, ref. 353077) se agregó 50ul de los PBMC por pocillo teniendo un total de 200 000 células. Para cada voluntario se consideró como mínimo 12 pocillos para las siguientes condiciones:

Pocillo 1: 100ul de medio MLR (Control negativo de proliferación)

Pocillo 2: 50ul de MLR + 50ul PHA 3X (Control positivo de proliferación)

Pocillo 3: 50ul de medio DMEM + 50ul PHA 3X (Control blanco de medio)

Pocillo 4-6: 50ul de secretoma de CEMh + 50ul PHA 3X

Pocillo 7-9: 50ul de secretoma de CEMh pretratadas con 10ug/ul de ASL + 50ul PHA 3X

Pocillo 10-12: 50ul de secretoma de CEMh pretratadas con 10ug/ul de LPS + 50ul PHA 3X

La PHA (Invitrogen, ref. 004977-93) fue preparada en medio MLR y se consideraron los pocillos para cada experimento independiente de obtención de secretoma. Los secretomas liofilizados fueron reconstituidos en el mismo volumen de agua esteril. Los PBMC fueron cultivados por 4 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, agregando el día 2, 50ul más de medio MLR (Figura 10).

### **Inducción de la producción de citoquinas**

Para realizar la inducción de la producción de citoquinas a los cultivos de PBMC mencionados anteriormente al cuarto día se eliminó 100 ul del medio de cada pocillo sin alterar el botón de células. A continuación se agregó 100ul del mix de inducción: 100 ng/ml PMA (Sigma, ref. P8139), 2 ug/ml Ionomycin (Sigma, ref. I0634), Brefeldin 2X (BioLegend, ref. 420601) en medio MLR. La placa se incubó por 4 h a 37 °C.

### **Evaluación por citometría de flujo**

Se evaluaron los marcadores de membrana: CD8, CD25 y los marcadores internos CD4, INF $\gamma$  y FOXP3. Además de la proliferación por CTV y la viabilidad.

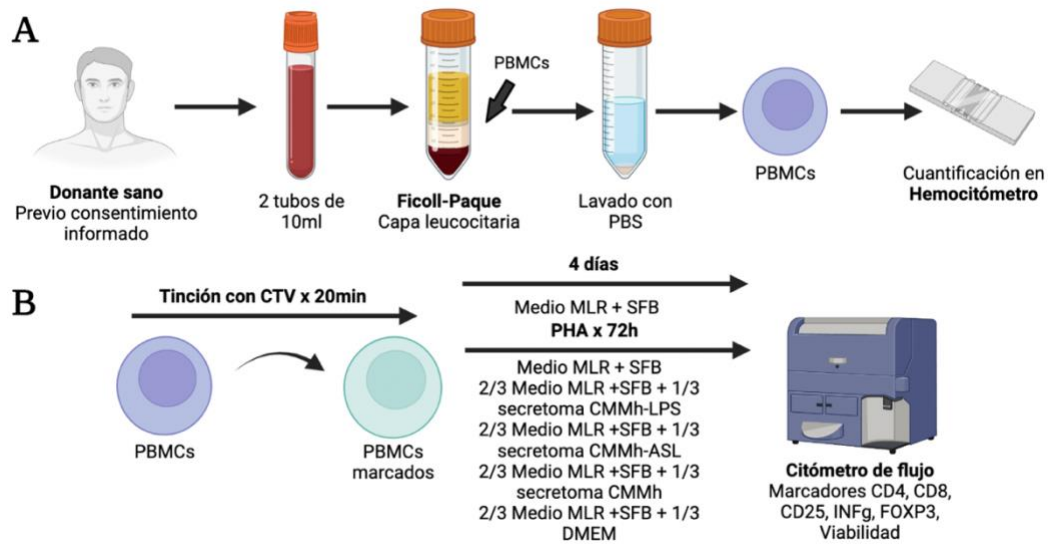
Luego de la inducción de la producción de citoquinas la placa fue centrifugada a 400 xg por 5 min. Para el marcaje de superficie se eliminó el sobrenadante y se agregó 30ul por pocillo del mix de superficie: 1:200 CD8-PE (BD, ref. 555367) y 1:200 CD25-PerCy5 (BD, ref. 555433) en PBS. Se incubó por 10 min a 4 °C en oscuridad y se agregó 30 ul del marcador de viabilidad 1:2000 Near-IR fluorescent dye (Lyfe Technologies, ref. L10119). Se incubó por otros 10 min a 4 °C en oscuridad y se centrifugó a 400 xg por 5 min.

Seguidamente, para el marcaje intracelular se eliminó el sobrenadante y se agregó 60 ul del mix de permeabilización: TF Fix/Perm Buffer (Invitrogen, ref.00-5123-43), TF Diluent Buffer (Invitrogen, ref. 00-5223-56). Se incubó por 30 min a 4 °C en oscuridad y se agregó 100 ul de Perm Wash 1X

(Invitrogen, ref. 00-8333-56). Se centrifugó a 400 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 30 ul del mix intracelular: 1:100 INF $\gamma$ - APC (BD, ref. 551385), 1:100 FOXP3-FITC (BD, ref. 560047), 1:200 CD4-PECy7 (BD, ref.557852) en Perm Wash 1X. Se incubó por 30 min a 4 °C en oscuridad y se añadió 100 ul de Perm Wah 1X. A continuación la placa fue centrifugada a 400 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente las células se resuspendieron en 100 ul de PBS. Para cada uno de los marcadores se consideró pocillos de compensación, además de controles de isotipo y pocillos blanco, sin marcaje.

La lectura de las muestras se realizó en el citómetro Facs Canto II (BD) El control negativo o blanco fue utilizado para identificar la población y establecer los parámetros de voltaje. Seguidamente se realizó la compensación de cada fluoróforo con sus respectivos marcadores independientes. El umbral de positividad fue definido por los controles de isotipo, para luego hacer la lectura de las muestras.

Para el análisis y presentación final de los datos se utilizó el programa FlowJo v10.7.2 (BD). El flujo de trabajo consistió en definir la población de PBMC y dentro de esta los singletes y posteriormente las células viables. Seguidamente se definió la población CD4+ y CD8+. Dentro de la población CD4+ se definió la población de células Treg por los marcadores CD25+FOXP3+ y células Th1 por los marcadores CD4+INF $\gamma$ +, mientras que en la población CD8+, se definió la población CD8+INF $\gamma$ +. Finalmente se calculó independientemente el porcentaje de proliferación e índice de proliferación (IP) en las poblaciones CD4+ y CD8+.



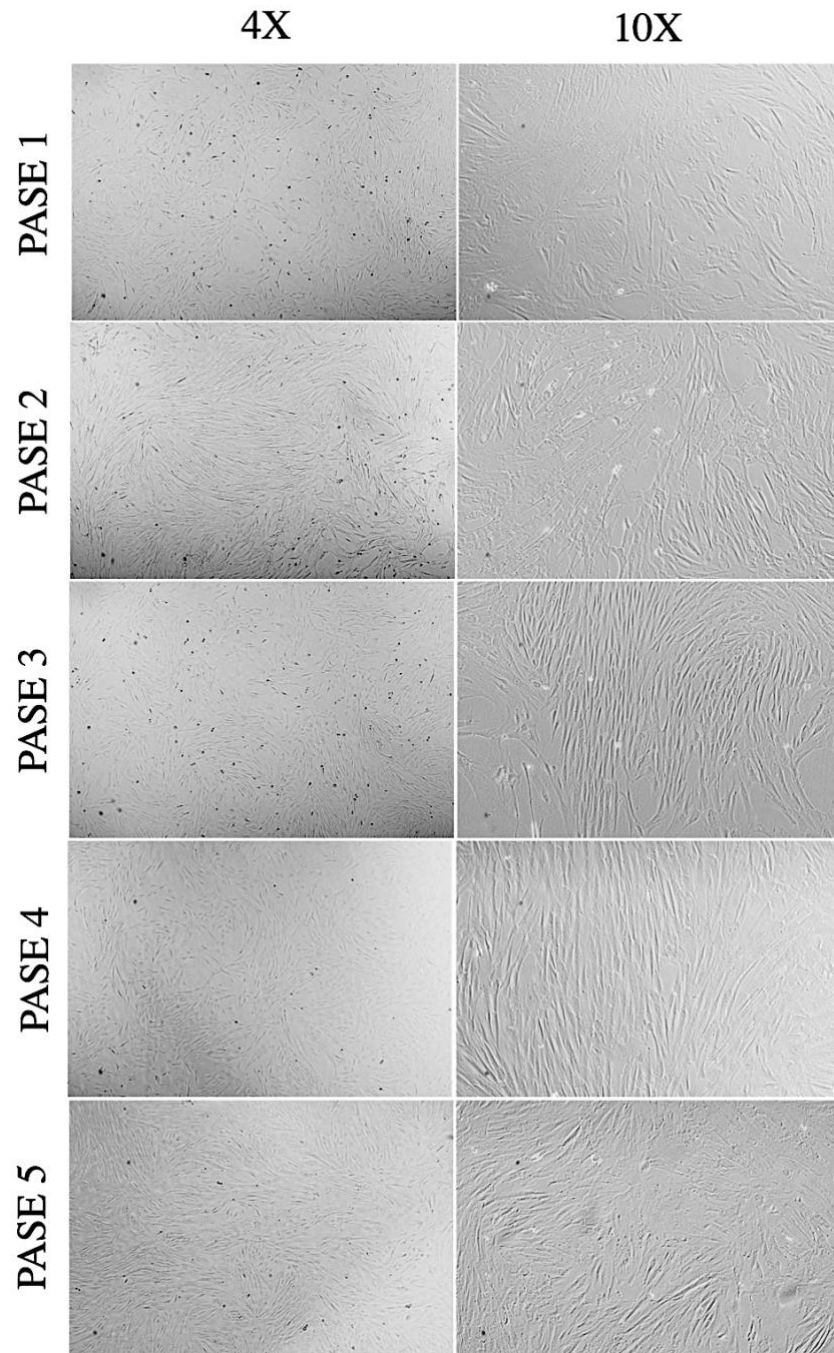
**Figura 10. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los secretomas pretratados con LPS y ASL.** A) Aislamiento de PBMCs a partir de sangre periférica de voluntarios sanos B) Ensayo de inmunomodulación y linfoproliferación *in vitro*. CTV: “Cell Trace Violet stain”

### 5.2.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron estadísticamente en GraphPad Prism 9 (versión 9.3.1). Para los experimentos de caracterización de expresión de citoquinas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mientras que para el ensayo funcional se utilizó el análisis pareado no paramétrico de Friedman. En ambos casos se utilizó la prueba de comparación múltiple de Dunn para determinar diferencias significativas entre los grupos. La diferencia estadísticamente significativa tuvo un  $p\text{-value} \leq 0,05$ .

## VI. RESULTADOS

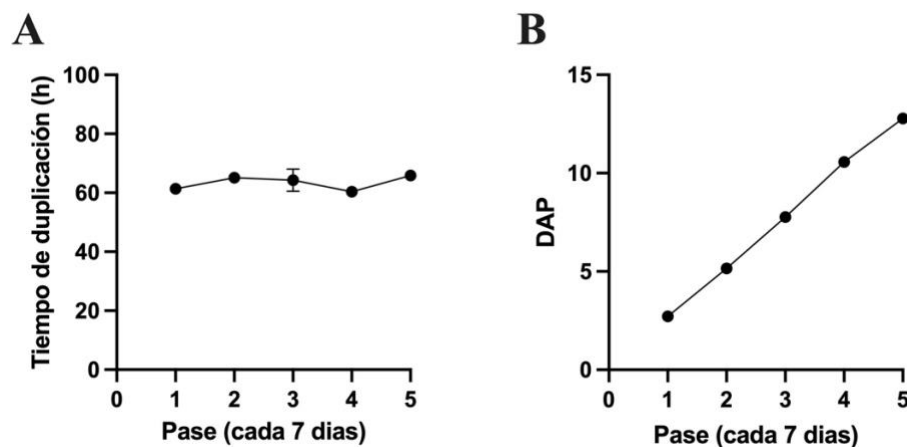
### 6.1. CARACTERIZACIÓN DE CEMh DE GELATINA DE WHARTON



**Figura 11. Morfología del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton a través de los pases. Campos representativos de cada pase a 4X y 10X.**

Las CEMh aisladas a partir de gelatina Wharton se mantuvieron en cultivo por 5 pases consecutivos (35 días) para su caracterización. A lo largo de los pases las células mostraron una morfología fibroblástica típica de las CEMh y su capacidad de adherencia al plástico (Figura 11).

La evaluación de su cinética de crecimiento mostró un tiempo de duplicación (Td) promedio de 63.4h que a su vez fue constante a través de los pases (Figura 2A). Asimismo el doblaje acumulativo poblacional (DAP) mostró que durante el tiempo de cultivo la población se duplicó 13 veces, manteniendo una tendencia exponencial de crecimiento (Figura 12B, Anexo 2).

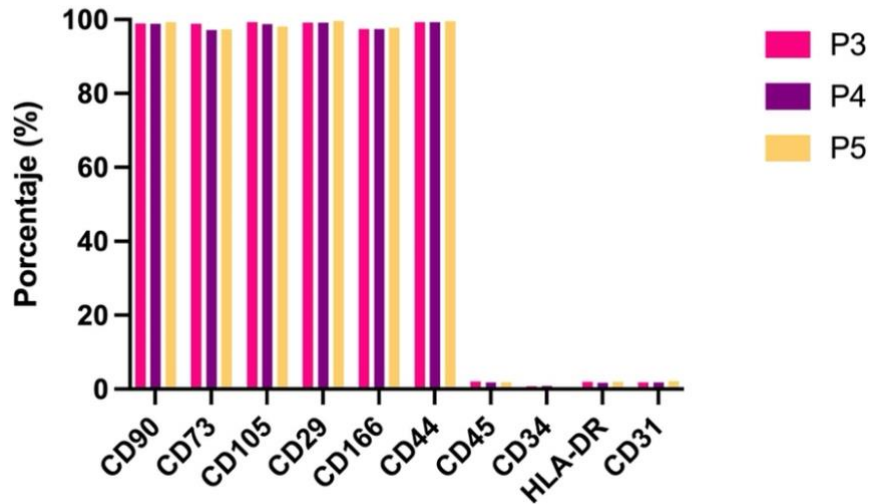


**Figura 12. Cinética de proliferación del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.**

**A)** Tiempo de duplicación **B)** Doblaje acumulativo poblacional (DAP) Los datos corresponden a la media mas la desviación estándar de tres replicas.

La caracterización inmunofenotípica de marcadores de superficie se evaluó en 3 pases consecutivos, pase 3, 4 y 5, para confirmar la estabilidad de la expresión de estos marcadores en la población. La expresión de los marcadores positivos para CEMh se mantuvo mayor al 96%, siendo en promedio 98.7% para CD105, 97.73% para CD73, 99% para CD90, 99.3% para CD29, 97.47% para CD166, y

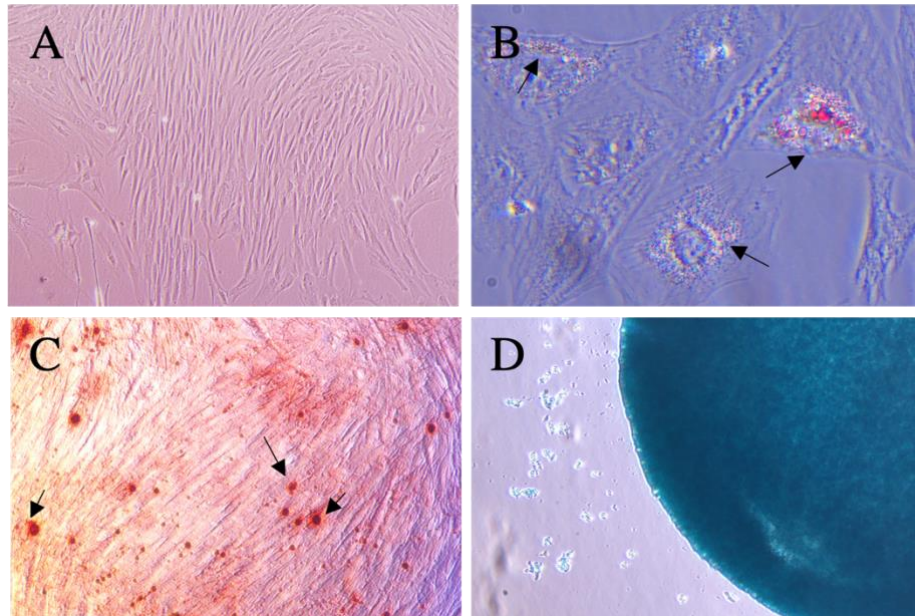
99.4% para CD44. Mientras que la expresión de los marcadores negativos se matuvo menor al 2%, siendo en promedio 1.85% para CD45, 0.74% para CD34, 1.86% para CD31y 1.9% para HLA-DR (Figura 13, Anexo 3 y 4).



**Figura 13. Caracterización inmunofenotípica del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.** La evaluación de los marcadores de superficie por citometria de flujo se realizó en 3 pases consecutivos: P3, P4 y P5.

Finalmente la evaluación de la capacidad de diferenciación hacia adipocito, osteoblasto y condroblasto mostró el potencial del cultivo de CEMh de diferenciarse a estos tres linajes celulares. La diferenciación hacia adipocito se logró en 10 días con la observación de vacuolas lipídicas, las cuales se tiñeron de rojo con la tinción Oil red 1% (Figura 14B). Hacia osteoblasto se logró a los 17 días con la observación de depósitos de calcio, los cuales se tiñeron de rojo con la tinción con Alizarin red 2% (Figura 14C). Mientras que la diferenciación hacia condroblasto se logró en 21 días con la observación de células teñidas de color azul con Alician Blue 1%, tanto en la microesfera como individualmente. El Alician Blue forma un complejo con los proteoglicanos de la membrana de

los condroblastos (Figura 14D). Cabe resaltar que los controles no se diferenciaron y tampoco fueron teñidos por las tinciones antes mencionadas (Figura 14A).

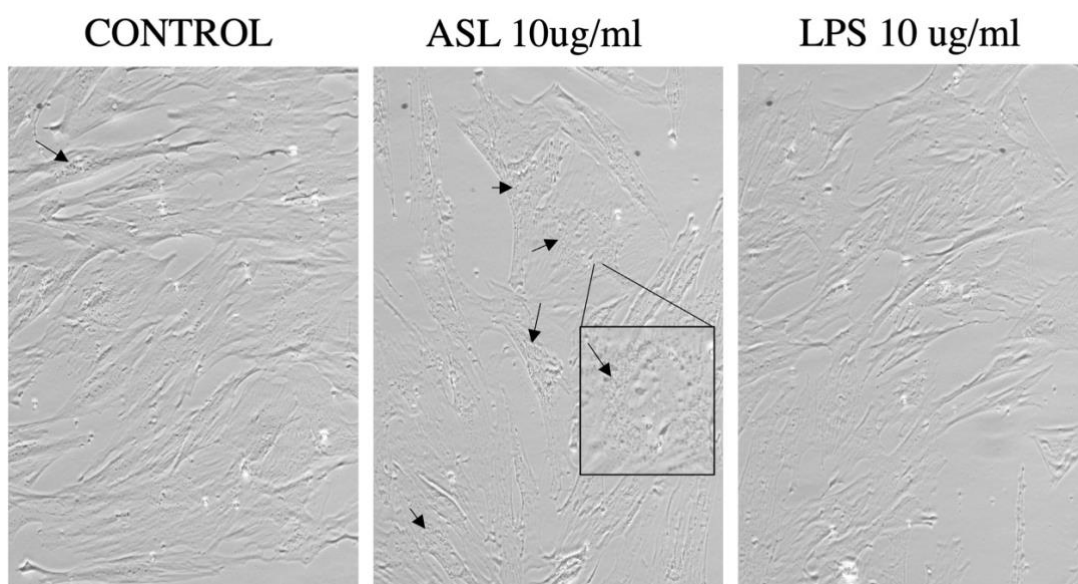


**Figura 14. Evaluación de la capacidad de diferenciación del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton. A) Células no diferenciadas, B) Diferenciación hacia adipocitos. Las células fueron teñidas con Oil red al 1%, aumento 20X. La flecha negra indica una célula con una gran cantidad de vacuolas teñidas de rojo, C) Diferenciación hacia osteoblastos. Las células fueron teñidas con Alizarin red al 2%, aumento 10X. La flecha roja indica un cúmulo de calcio y otros minerales, aumento 10X. D) Diferenciación hacia condroblastos. Células teñidas con Alician Blue al 1%. Las fotos corresponden a campos representativos de células diferenciadas en el pase 3.**

En este sentido el cultivo cumpliría todos los requerimientos para ser considerado un cultivo de células estromales mesenquimales humanas (CEMh).

## 6.2. PREESTIMULACIÓN DEL CULTIVO DE CEMh DE GELATINA DE WHARTON

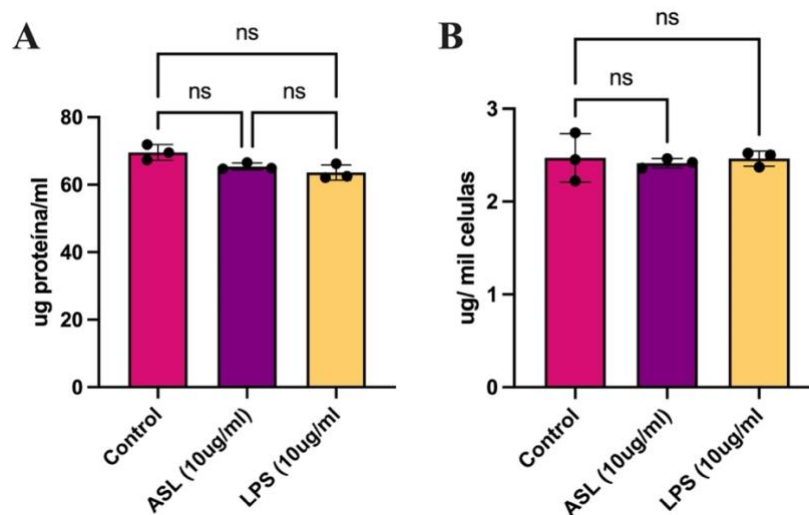
El cultivo de CEMh de gelatina de Wharton pretratado con LPS y ASL en el pase 4 presentó diferencias en la expresión de gránulos citoplasmáticos luego de 72h del pretratamiento. El pretratamiento con 10ug/ml de ASL aumentó el número de gránulos citoplasmáticos alrededor del núcleo en comparación a las células control sin pretratamiento y pretratadas con 10ug/ml de LPS. Cabe resaltar que luego de 24h de eliminar el estímulo los gránulos en las células con pretratamiento de 10ug/ml de ASL.



**Figura 15. Preestimulación del cultivo de CEMh de gelatina de Wharton.** La flechas negras hace referencia a los gránulos. El cuadro representa una ampliación de una de las células. Aumento 20X.

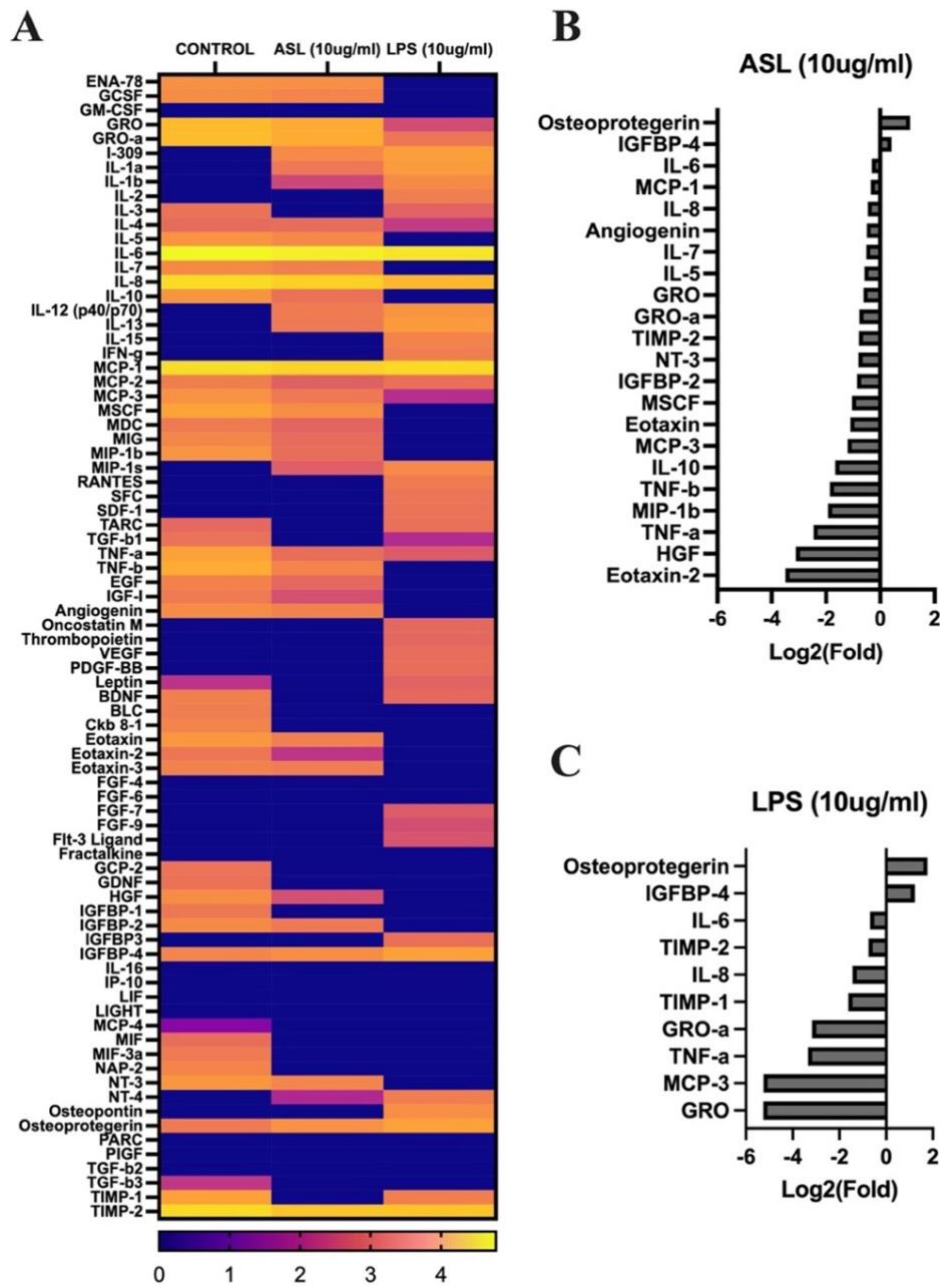
### 6.3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS SECRETOMAS

Los secretomas obtenidos luego del pretratamiento con 10ug/ml de ASL y 10ug/ml de LPS no presentaron variaciones en la cantidad de proteínas totales en relación al secretoma control sin pretratamiento. Obteniendo en promedio 66.2ug de proteína por ml (Figura 16A, Anexo 5) y 2.4ug de proteína por cada mil células (Figura 16B, Anexo 5).



**Figura 16. Cantidad de proteínas totales en los secretomas.** A) Se representa la cantidad de proteína por ml de secretoma. B) Se representa la cantidad de proteína por cada mil células. Cada punto representa un experimento independiente de obtención de secretoma. Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. ns: no significativo p-value > 0.05.

La evaluación de expresión de citoquinas mediante el panel de quimioluminiscencia de 80 blancos mostró diferencias en la expresión de citoquinas según el pretratamiento utilizado.



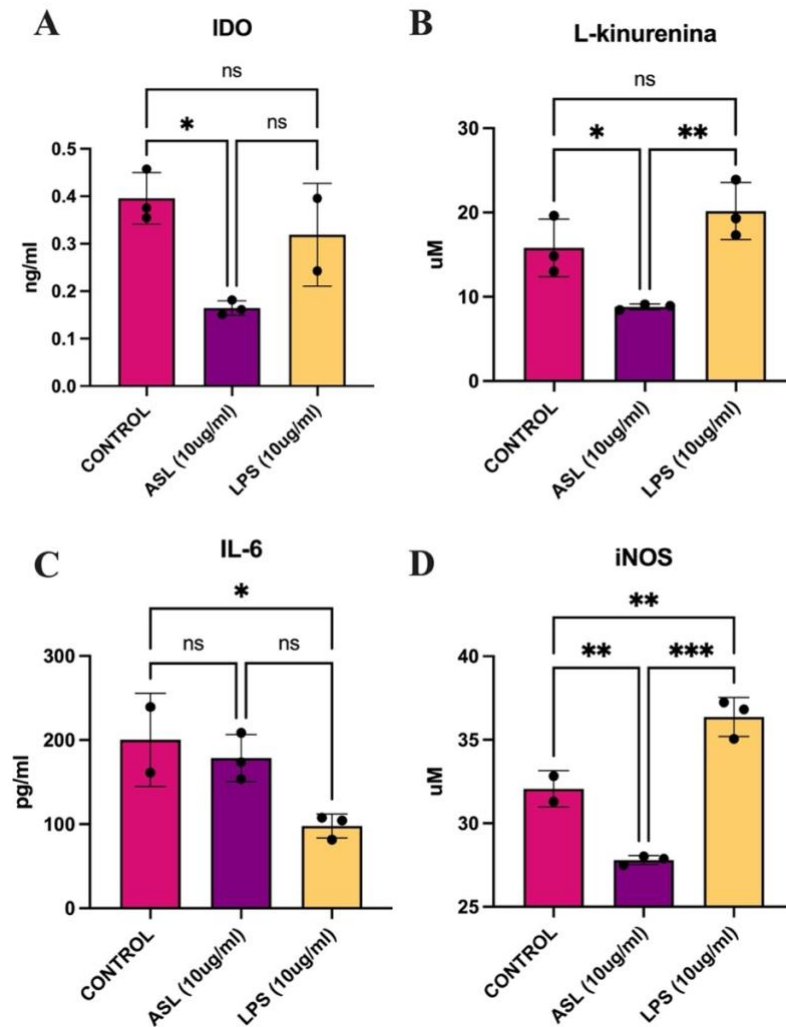
**Figura 17. Evaluación de la expresión de citoquinas en los secretomas.** A) Mapa de calor de la expresión de 80 citoquinas en los secretomas control, 10ug/ml ASL y 10ug/ml LPS. Se representa la expresión como Log(Intesidad de señal) B) Cambios en la expresión frente al control sin pretratamiento del secretoma pretratado con 10ug/ml de ASL C) Cambios en la expresión frente al control sin pretratamiento del secretoma pretratado con 10ug/ml de LPS. Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárido de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*

El pretratamiento con 10ug/ml de LPS, aumentó más del doble la expresión de citoquinas como Osteoprotegerin e IGFBP-4. Además disminuyó la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, más del doble de la expresión de IL-8 y más de ocho veces la expresión de GRO $\alpha$ , TNF $\alpha$ , MCP-3 y GRO. Mientras que otras citoquinas que estaban presentes en el secretoma control ya no tenían una expresión detectable como IL-7, IL-5, TNF $\beta$  e IL-10 (Figura 17A y B, Anexo 6). Asimismo, se encontró que citoquinas no presentes en el secretoma control sí eran expresadas como I-309 (CCL1), IL-2, IL-1a, INF $\gamma$ , IL-12, entre otras (Figura 17A y C, Anexo 6).

Por otro lado, el pretratamiento con 10ug/ml de ASL aumentó la expresión de la citoquina IGFBP-4 y más del doble la expresión de Osteoprotegerin. Además disminuyó la expresión de proteínas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-7, IL-5, GRO; disminuyó mas del doble la expresión de M-SCF, IL-10, TNF $\alpha$  y más de cuatro veces la expresión de TNF $\beta$ . Mientras que otras que estaban presentes en el secretoma control ya no tenían una expresión detectable como IL-3, GDNF y TIMP-1. Asimismo se observó que citoquinas no presentes en el secretoma control eran expresadas como I-309 (CCL1), IL-12, IL-13 y IL-1 $\alpha$  (Figura 17A y B, Anexo 6).

Por su parte, los ensayos cuantitativos mostrarón que el pretratamiento con 10ug/ml de LPS aumentó significativamente los niveles de expresión de iNOS y disminuyó significativamente los niveles de IL-6 confirmando la tendencia encontrada en el array. Mientras que los niveles de expresión de IDO y L-kinurenina no mostraron diferencias significativas frente al secretoma control. Por otro lado, el pretratamiento con 10ug/ml de ASL disminuyó

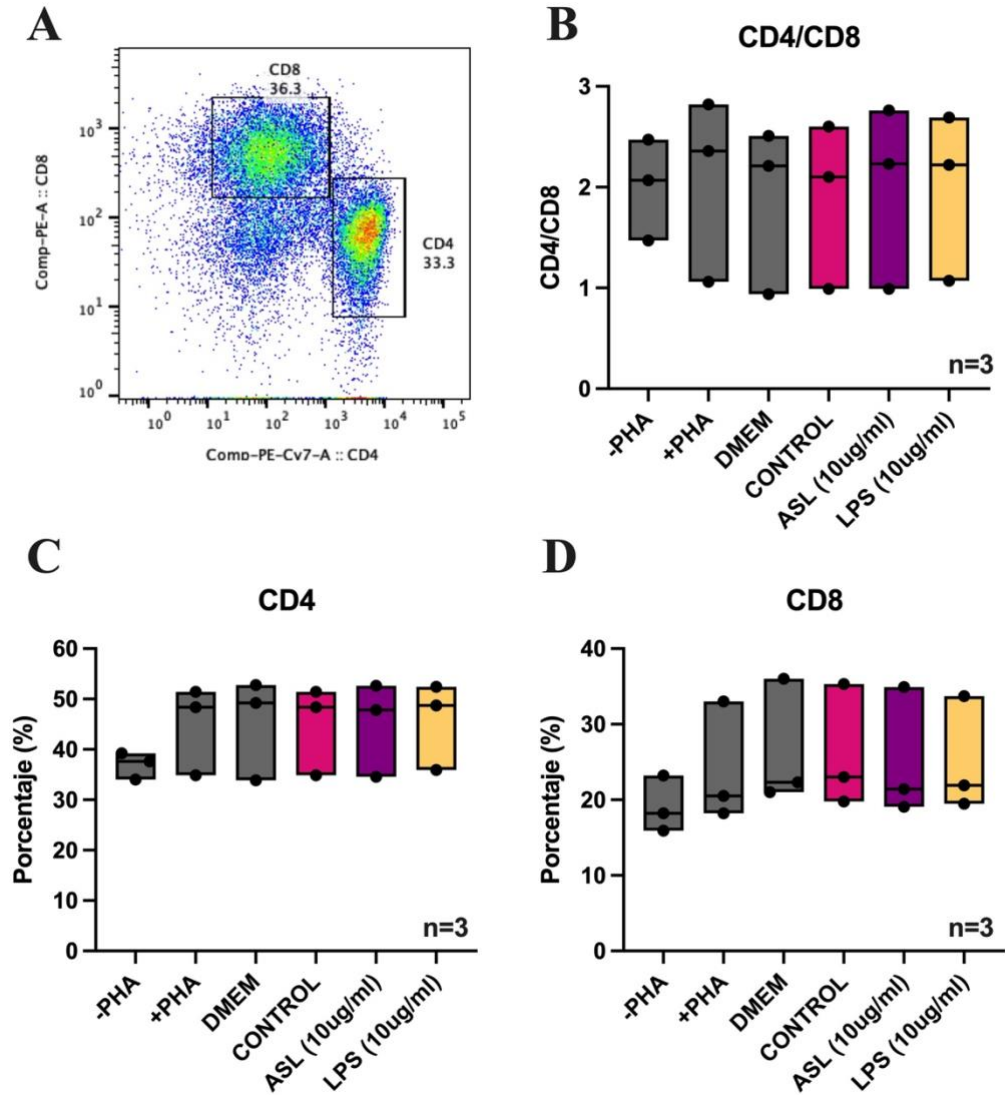
significativamente los factores inmunomoduladores IDO, L-kinurenina e iNOS mientras que los niveles de expresión de IL-6 permanecieron similares al secretoma control sin pretratamiento. Cabe resaltar que IL-6 presentó una tendencia a la baja, similar a lo observado en el array. (Figura 18A-D, Anexo 7)



**Figura 18. Cuantificación de factores inmunomoduladores en los secretomas. A)** Cuantificación de los niveles de expresión de IDO en los secretomas. Los valores fueron extrapolados a partir de las absorbancias del ensayo ELISA con una curva estándar (R-cuadrado=0.9902) **B)** Cuantificación indirecta de IDO mediante los niveles de L-kinurenina en los secretomas. Los valores fueron extrapolados a partir de las absorbancias con una curva estándar (R-cuadrado=0.9988) **C)** Cuantificación de los

niveles de expresión de IL-6 en los secretomas. Los valores fueron extrapolados a partir de las absorbancias con una curva estándar (R-cuadrado=0.9984) **D**) Cuantificación indirecta de iNOS en los secretomas mediante la reacción de Greiss. Los valores fueron extrapolados a partir de las absorbancias con una curva estándar (R-cuadrado=0.9929) Cada punto representa un experimento independiente de obtención de secretoma. Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. ns: no significativo p-value > 0.05. \*p-value<0.05 \*\*p-value<0.01 \*\*\*p-value<0.001

**6.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA *in vitro* DEL SECRETOMA**



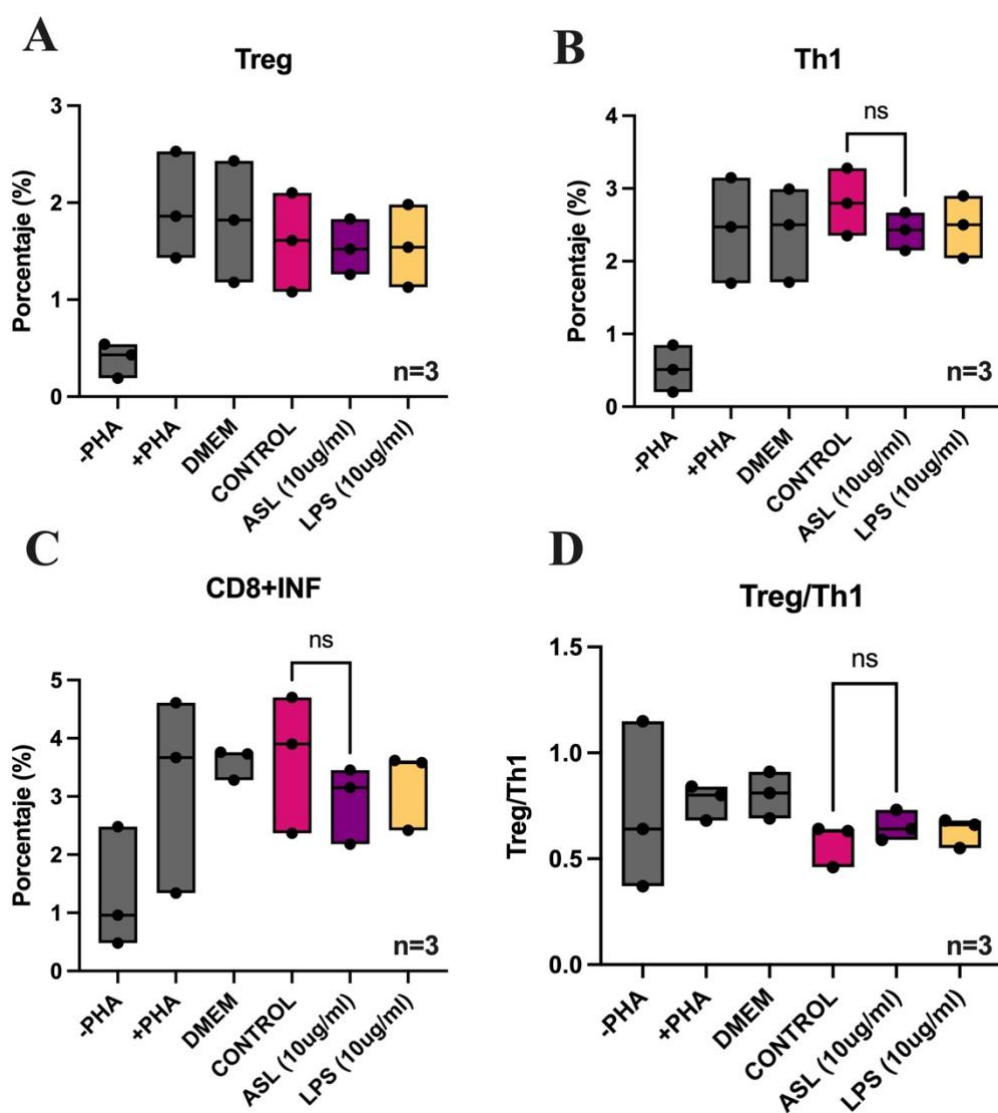
**Figura 19.** Evaluación del efecto de los secretomas en poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ **A)** Grafico modelo de las poblaciones CD4+ y CD8+ seleccionadas **B)** Índice CD4/CD8 para los distintos tratamientos (n=3) **C)** Porcentaje de la población CD4+ en los distintos tratamientos (n=3) **D)** Porcentaje de la población CD8+ en los distintos tratamiento (n=3) Cada punto representa el promedio de las tres replicas por voluntario. +PHA: con fitohemaglutinina, -PHA: sin PHA, Control: Secretoma sin

pretratamiento, LPS: Lipopolisacárido de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* , DMEM: medio base de recolección de los secretomas

La evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los secretomas se realizó mediante un ensayo funcional con PBMC de personas sanas (n=5), con una concentración final de proteínas del secretoma de 22ng/ul, tomando como referencia la cuantificación por Qubit previa a la liofilización. En este ensayo se evaluó los cambios en los porcentajes de las poblaciones linfocitarias. De los 5 voluntarios, 2 muestras no fueron consideradas para los análisis finales al tener una viabilidad menor al 60%.

En torno a los porcentajes de las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+, estas no se vieron afectadas de manera individual por los secretomas de células pretratadas con 10ug/ml ASL y 10ug/ml LPS en relación al secretoma control sin pretratamiento (Figura 9A,C-D, Anexo 8). Asimismo el índice CD4/CD8 tampoco se vio afectado por ninguno de los tratamientos en relación al control (Figura 19B, Anexo 8).

Por otro lado, el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias Th1 y CD8+INF $\gamma$ + tuvo una ligera tendencia a la baja con los secretomas de células pretratadas con 10ug/ml de ASL y 10ug/ml de LPS, pero esta disminución no llegó a ser significativa. Cabe resaltar que esta tendencia fue mayor para el secretoma de CEMh pretratadas con ASL y se observó en los 3 voluntarios también de manera individual (Figura 10B y C, Anexo 8))



**Figura 20. Evaluación del efecto de los secretomas en subpoblaciones linfocitarias Th1, Treg, CD8+INF $\gamma$ +** **A)** Porcentaje de la subpoblación Treg (CD25+FOXP3+) en los distintos tratamiento (n=3) **B)** Porcentaje de la subpoblación Th1 (CD4+INF $\gamma$ +) en los distintos tratamiento (n=3) **C)** Porcentaje de la subpoblación CD8+INF $\gamma$ + en los distintos tratamiento (n=3) **D)** Índice Treg/Th1 para los distinto tratamientos (n=3). Cada punto representa el promedio de las tres replicas por voluntario. +PHA: con fitohemaglutinina, -PHA: sin PHA, Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*, DMEM: medio base de recolección de los secretomas. ns: no significativo

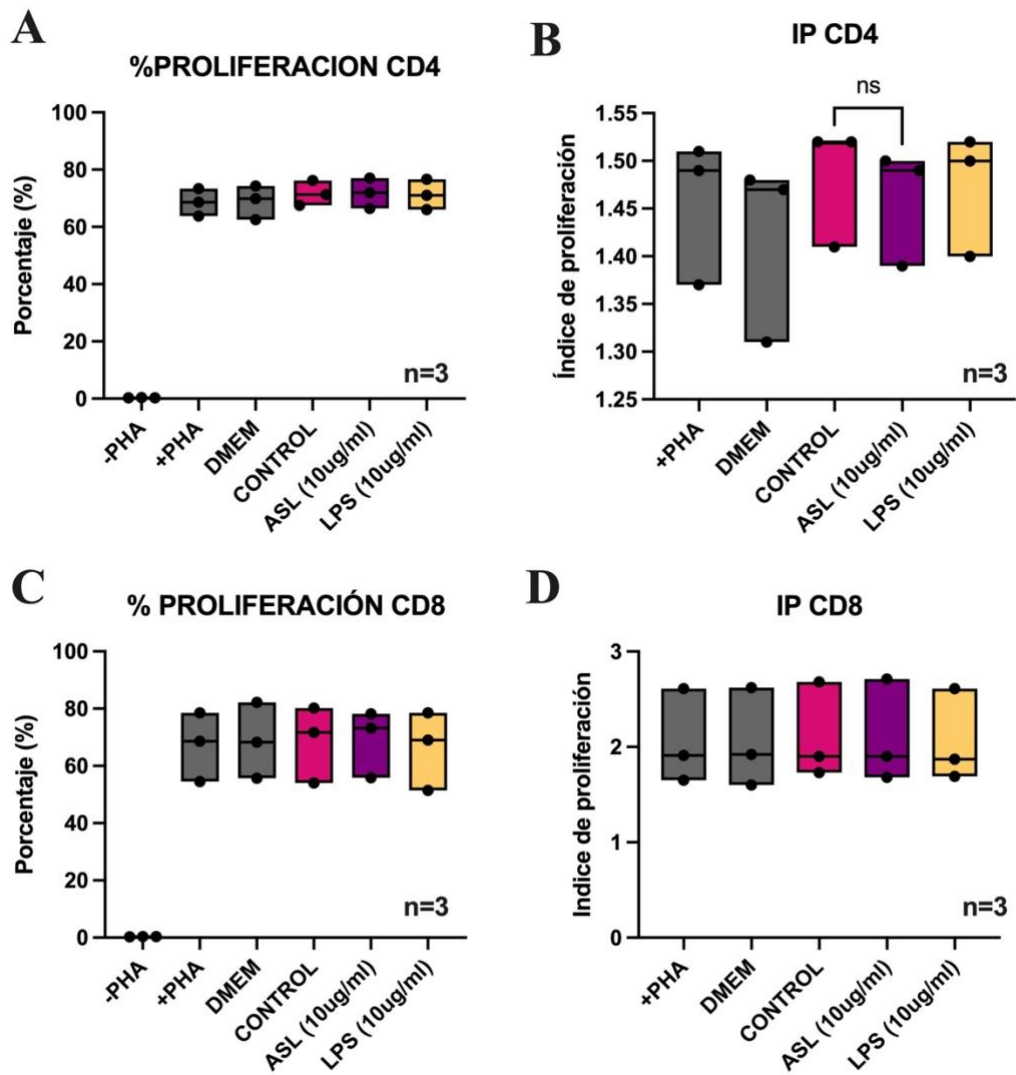
Asimismo, la subpoblación de Treg (CD25+FOXP3+) no se vio alterada con los secretomas pretratados con ASL y LPS. Sin embargo la relación Treg/Th1 mostró una ligera tendencia al aumento en relación al secretoma control, sin llegar a ser significativa, principalmente con el secretoma pretratado con ASL (Figura 20 A y D). Esta tendencia también se observó en cada voluntario de manera individual (Anexo 8).

#### **6.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DEL SECRETOMA**

La evaluación de la capacidad antiproliferativa de los secretomas se realizó mediante el ensayo funcional mencionado anteriormente con PBMC de personas sanas (n=5) y con un marcaje de las células con CTV. Se evaluó tanto el porcentaje de proliferación como el índice de proliferación linfocitaria. De los 5 voluntarios, 2 muestras no fueron consideradas para los análisis finales al tener una viabilidad menor al 60%.

En la evaluación de la linfoproliferación, el porcentaje de proliferación de los linfocitos CD4+ no mostró diferencias entre los tratamientos (Figura 21A y B, Anexo 9). Asimismo, el porcentaje de proliferación y el índice de proliferación de los linfocitos CD8+ tampoco mostraron diferencias significativas en relación al secretoma control sin pretratamiento (Figura 21C y D, Anexo 9).

Finalmente se rescata que el secretoma control de células sin pretratamiento no mostró diferencias significativas con el control DMEM sin secretoma, ni en los índices de proliferación ni en las poblaciones celulares antes mencionadas.



**Figura 21.** Evaluación del efecto de los secretomas la linfoproliferación de las poblaciones CD4+ y CD8+ **A)** Porcentaje de linfocitos CD4+ en proliferación en los distintos tratamiento (n=3) **B)** Índice de proliferación de los linfocitos CD4+ en los distintos tratamiento (n=3) **C)** Porcentaje de linfocitos CD8+ en proliferación en los distintos tratamiento (n=3) **D)** Índice de proliferación de los linfocitos CD8+ en los distintos tratamiento (n=3). Cada punto representa el promedio de las tres replicas por voluntario. +PHA: con fitohemaglutinina, -PHA: sin PHA, Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* , DMEM: medio base de recolección de los secretomas

## VII. DISCUSIÓN

La plasticidad de las CEMh al enfrentarse a un estímulo y potenciar sus propiedades inmunomoduladoras ha abierto las puertas para poder considerar terapias dirigidas según el estímulo (Noronha Nc et al., 2019). En la presente tesis, por primera vez se reporta el uso del ASL de la especie *Leishmania braziliensis* en células estromales mesenquimales humanas (CEMh), con el fin de desarrollar una terapia celular dirigida a la enfermedad causada por esta especie.

El cultivo utilizado para la estimulación y recolección del secretoma cumplió los estándares internacionales dados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas inglés), para poder ser considerada una población de células estromales mesenquimales o células madre mesenquimales: la adherencia al plástico, la capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblasto, adipocito y condroblasto, y la expresión de marcadores de superficie de linaje mesodermales CD105, CD73 y CD90 (>96%) y la carencia de marcadores de linaje hematopoyético CD45, CD34 y HLA-DR (<2%) (Dominici et al., 2006). Asimismo dentro de los 35 días de cultivo (5 pases consecutivos) el tiempo de duplicación (Td) promedio de 63.4h fue similar a lo reportado en otras líneas de CEM derivadas de gelatina de Wharton en similares condiciones de cultivo (Salehinejad et al., 2012). Cabe rescatar que la población de CEMh también expresó tres marcadores de superficie no considerados por la ISCT en un porcentaje mayor al 96%, el CD166, el CD44 y el CD29. El CD166 ha sido reportado como el mejor candidato para diferenciar las CEMh de los fibroblastos y de esta manera mejorar el conjunto de marcadores para la identificación de

estas células (Brinkhof et al., 2020). Mientras que la alta expresión de CD44 y CD29 está relacionada con un aumento en la capacidad de migración u homing de las CEMh (Ke et al., 2015; Morath et al., 2016; Zhu et al., 2006). En este sentido la expresión de estos marcadores apoya la caracterización del cultivo de CEMh y refuerza la presencia de propiedades atractivas para su uso en terapia celular.

La inmunoplasticidad de las CEMh se relaciona con su capacidad de responder a estímulos en su microambiente de forma ambivalente, presentando desde perfiles antiinflamatorios hasta proinflamatorios (Glenn, 2014; Regmi et al., 2019). En la estimulación con 10ug/ml de ASL las primeras diferencias se observaron a las 72h de pretratamiento con la presencia de un mayor número de gránulos citoplasmáticos alrededor del núcleo. Esto se podría explicar como una respuesta de estrés de las CEMh frente a la gran cantidad de vías que estaría activando el ASL, principalmente desde los TLRs (Rojas-Bernabé et al., 2014; Vieira et al., 2019). Sin embargo, al no haber evaluado señales apoptóticas serán necesarios estudios complementarios para comprender mejor el efecto del ASL de la especie *L. braziliensis* sobre el fenotipo de las CEMh. Cabe resaltar que el tiempo de estimulación de 72h fue seleccionado al ya haber reportes con antígenos como el LPS, que mencionan que tiempos mayores a 48h presentan perfiles más antiinflamatorios mientras que tiempos menores a 12h perfiles proinflamatorios (Kurte et al., 2020). Además, el único estudio que utilizó ASL de la especie *L. major* en células madre mesenquimales consiguió perfiles antiinflamatorios luego de 72h de estimulación (Khosrowpour et al., 2017). Sin

embargo, sería importante plantear a futuro la comparación con otros tiempos de estimulación.

La caracterización de los secretomas sin estimulación, con preestimulación de 10ug/ml de ASL y el control positivo con preestimulación de 10ug/ml de LPS, no mostró diferencias en la cantidad de proteínas totales, pero sí diferencias claras a nivel de expresión de citoquinas y factores inmunomoduladores. El secretoma de CEMh preestimuladas por 72h con 10ug/ml de LPS mostró el aumento significativo del factor iNOS/NO y la disminución de la citoquina proinflamatoria IL-6 en relación al secretoma control. Asimismo se observó que la preestimulación mantuvo los niveles deIDO y disminuyó la expresión de otras citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-8 y GRO. En este sentido la preestimulación con LPS favorecería un secretoma con un perfil más antiinflamatorio que el secretoma control.

Se conoce que la inmunoplasticidad de las CEM estimuladas con LPS está comandado en gran medida por el TLR4 (Mei et al., 2013) y la activación de las vías dependientes de MyD88, relacionadas con la producción de proteínas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6 (Kurte et al., 2020) , así como por las vías independientes de MyD88, relacionadas con la liberación genes inducibles por INF (Akira & Takeda, 2004). En base a nuestros resultados podemos suponer que nuestra estimulación con LPS estaría favoreciendo principalmente la activación de la vía independiente de MyD88, lo que podría explicar la menor producción de las proteínas proinflamatorias como IL-6. Asimismo en torno al aumento de la expresión de iNOS/NO se conoce que el LPS es un activador clásico de la expresión de este factor (Elamir et al., 2015). Perfiles

antiinflamatorios como el de la presente tesis han sido reportados. Kurte et al., (2020) reportaron que la estimulación con 500ng/ml de LPS a CEM derivadas de médula ósea de ratón en exposiciones prologadas mayores a 48h favorecía un perfil antiinflamatorio de las células con un aumento de la expresión génica de iNOS y la disminución de IL-6 a nivel celular. Sin embargo, a nivel de secretoma, solo se ha evaluado inmediatamente luego de la estimulación, reportando perfiles proinflamatorios con el aumento de IL-6 y IL-8 (Mei et al., 2013; Waterman et al., 2010).

Por otro lado el secretoma de células pretratadas con ASL de *L. braziliensis* a diferencia del control positivo y el control sin pretratamiento mostró la disminución significativa de los factores inmunomoduladores IDO e iNOS/NO. Sin embargo en relación al secretoma control los niveles de IL-6 no mostraron diferencias significativas, y se observó la disminución de otros factores proinflamatorios con TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-8, IL-7, IL-5 y GRO. Por lo que el pretratamiento con ASL también favorecería a un perfil más antiinflamatorio en relación al secretoma control.

El ASL al ser un conjunto de proteínas, lípidos, carbohidratos y otros componentes estaría activando simultáneamente varias vías desde distintos receptores incluidos los TLRs: TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 (Tuon et al., 2012). Por ejemplo, el lipofosfoglicano (LPG), abundante en la membrana celular del parásito y que está relacionado con las variaciones interespecies en la inmunopatología de la enfermedad, puede interactuar con el TLR2 y TLR4 activando las vías dependientes e independientes de MYD88 (Rojas-Bernabé et al., 2014; Vieira et al., 2019). Siendo esta interacción mucho más fuerte para la

especie *L. braziliensis* (Ibraim et al., 2013). En CEMh se ha reportado la expresión de TLR2 y TLR4 (Mei et al., 2013; Raicevic et al., 2010), por lo que la inmunoplasticidad vista en la presente tesis frente al ASL estaría dado por lo menos por estos receptores. En base a nuestros resultados podemos suponer que al igual que con el LPS se estaría favoreciendo la activación de vías independientes de MYD88, lo que se relacionaría con la menor producción de proteínas proinflamatorias. Mientras que la disminución deIDO e iNOS posiblemente esté relacionada con la activación de otras vías.

Asimismo, mediante el array de citoquinas también se encontró el incremento de Osteoprotegerin y IGFBP-4 tanto para los pretratamientos por ASL como LPS. En CEM, Osteoprotegerin ha sido relacionado con la inhibición de la osteoclastogenesis (Oshita et al., 2011) y el aumento de la capacidad de diferenciación osteogénica (Palumbo & Li, 2013). Lo que nos daría a entender que los pretratamientos podrían estar aumentando estas propiedades del secretoma. Mientras que el IGFBP-4 se ha relacionado con una acción proapoptótica y antiproliferativa en poblaciones celulares (Zhou et al., 2003). Siendo su presencia en el sobrenadante de CEMh relacionada con una menor proliferación y diferenciación hacia Treg (Miyagawa et al., 2017). Por lo que IGFBP-4 tendría un papel clave en la capacidad inmunomoduladora de nuestros secretomas. Cabe resaltar que la caracterización del secretoma se realizó exclusivamente de las proteínas solubles de este, sin embargo otros componentes como las microvesículas, microARNs y mitocondrias también podrían estar tomando un papel clave en la inmunomodulación por lo que deberán ser evaluados en posteriores estudios. Asimismo, en la presente tesis se trabajó con

un secretoma de 72h posterior a la eliminación del estímulo por lo que también se debe considerar si todos los componentes de este aún representan el perfil de las células estimuladas, así como la cinética y vida media de las proteínas secretadas. En este sentido, también se debe considerar la evaluación de otros tiempos de recolección del secretoma,

Para estudiar el potencial terapéutico del secretoma es necesario considerar la respuesta inmune en los pacientes con *Leishmania braziliensis*. Se conoce que esta respuesta se caracteriza en la forma cutánea por ser una respuesta controlada de linfocitos Th1, sin embargo, en la forma mucocutánea de la enfermedad presenta una respuesta citotóxica exacerbada por linfocitos CD8+INF $\gamma$ +, Th1 y neutrófilos, que también está relacionada con el daño del tejido y la cronicidad. Por lo que, tratamientos que busquen controlar esta respuesta inflamatoria exacerbada tendrían un mayor potencial terapéutico (C. I. de Oliveira & Brodskyn, 2012; Scott & Novais, 2016). En este sentido, se planteó el estudio de la capacidad inmunomoduladora y antiproliferativa en cultivos PBMC, centrándonos en las poblaciones linfocitarias.

En torno a la capacidad inmunomoduladora los resultados mostraron que el efecto de los secretomas estimulados con LPS y ASL en las poblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ y subpoblaciones Th1, Treg y CD8+INF $\gamma$ + no eran significativos en relación al secretoma control. A pesar de esto se observó ligeras tendencias en la disminución de las poblaciones proinflamatorias Th1 y CD8+INF $\gamma$ + con el secretoma de células pretratadas con ASL, así como una tendencia al aumento de la relación Treg/Th1, sin alteración de la población de Treg. Lo que se relaciona con el perfil antiinflamatorio encontrado a nivel de

citoquinas para el secretoma de CEMh pretratadas con ASL. La disminución de citoquinas proinflamatorias como IL-8, TNF $\alpha$ , IL-5, IL-7 y IL-6 favorecería la disminución de las poblaciones proinflamatorias Th1 y CD8+INF $\gamma$ +. La menor presencia del factor iNOS/NO favorecería la supervivencia de poblaciones linfocitarias incluida la población de las Treg, mientras que el aumento de IGFBP-4 provocaría una menor proliferación de las Treg. Esto explicaría el aumento de la relación Treg/Th1 sin observar cambios en la población de Treg. En resumen, la acción del secretoma de las CEMh pretratadas con ASL se centraría en disminuir las poblaciones proinflamatorias, pero a su vez proteger la población de Treg y posiblemente inducir poblaciones funcionales de estas. Sin embargo, estos resultados aún deben ser confirmados con un número muestral mayor, donde se esperaría ver significancias, además de estudios complementarios en donde evalúen las vías posiblemente involucradas. Cabe resaltar que el porcentaje de estas subpoblaciones dentro de las poblaciones linfocitarias es limitado y menor al 5% por lo que para conocer el verdadero efecto de nuestros secretomas sobre estas subpoblaciones, sería necesario aislarlas y evaluarlas independientemente.

En torno a los índices y porcentajes de proliferación para los linfocitos CD4+ y CD8+ tampoco se observó diferencias significativas con los secretomas de CEMh pretratadas con ASL y LPS. Cabe resaltar que hasta el momento no hay reportes del efecto antiproliferativo del secretoma de líneas de CEMh de gelatina de Wharton. Sin embargo, a nivel de cocultivos se conoce que el nivel de inhibición está estrechamente relacionado con la relación CEMh:PBMC y la preestimulación (Najar et al., 2018; Prasanna et al., 2010; Venugopal et al.,

2011). Estos resultados abren interrogantes sobre si el efecto en la proliferación de los linfocitos de nuestras células pretratadas no esté dado principalmente por las moléculas que secreta sino por otros mecanismos como el contacto directo célula a célula. En este sentido se deben considerar futuros estudios con cocultivos de PBMC con CEMh pretratadas con ASL.

Finalmente, en relación a los resultados del ensayo funcional que no mostraron un perfil claro, es necesario considerar lo siguiente. En primer lugar la calidad del secretoma utilizado. En la presente tesis se liofilizó el secretoma para facilitar su transporte. Sin embargo, la liofilización genera estrés sobre las proteínas, produciendo agregación y desnaturalización (W. Wang, 2000), lo que conduce a una pérdida de función y finalmente un menor efecto del secretoma sobre las PBMC. En segundo lugar, se debe considerar el efecto de nuestros secretomas en determinadas poblaciones celulares. Se resalta que a pesar de que la evaluación del secretoma en las poblaciones linfocitarias (CD8+INF $\gamma$ +, Th1 y Treg) nos ayudó a comprender el perfil de nuestro secretoma, el efecto de este frente a otras poblaciones celulares como monocito/macrófagos o neutrófilos podría ser mayor y más representativo. En tercer lugar, se debe considerar la concentración de los factores en el secretoma. En la presente tesis se utilizó secretoma sin concentrar, siendo en los ensayos funcionales un tercio del volumen del cultivo, por lo que algunas de las proteínas o factores no habrían tenido la concentración suficiente para provocar un efecto significativo en las poblaciones linfocitarias de las PBMC.

En resumen, el secretoma de las CEMh pretratadas con ASL de *Leishmania braziliensis* presentó diferencias a nivel de expresión de citoquinas con una

tendencia a un perfil más antiinflamatorio que el secretoma control . Sin embargo, no produjo efectos inmunomoduladores ni antiproliferativos significativos a nivel funcional en poblaciones linfocitarias en cultivos de PBMC, por lo que futuros estudios *in vitro* e *in vivo* aún son necesarios para confirmar el potencial uso del secretoma en úlceras de *Leishmania braziliensis*, en torno a su efecto inmunomodulador y regenerativo.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una población de células estromales mesenquimales humanas (CEMh) a partir de una fracción de gelatina de Wharton de cordón umbilical de donante sana.
- La población celular cumple con los estándares internacionales para ser considerada una población de células estromales mesenquimales: adherencia al plástico, capacidad de diferenciación hacia linajes mesodermales y expresión de marcadores de identidad y pureza.
- La estimulación de las CEMh con el antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* (ASL) induce cambios en su secretoma de 72h, relacionados con un perfil más antiinflamatorio con respecto al secretoma control de las CEMh no tratadas.
- El secretoma de las CEMh pretratadas con ASL está caracterizado por el aumento de IGFBP-4 y la disminución de proteínas proinflamatorias IL-8, TNF $\alpha$ , GRO y los factores iNOS/NO e IDO.
- El secretoma de CEMh pretratadas con ASL no muestra propiedades antiinflamatorias definidas en ensayos funcionales con poblaciones linfocitarias de PBMCs, pero sí muestra tendencias a la disminución de poblaciones proinflamatorias Th1 y CD8+INF $\gamma$ +, así como del aumento de la relación Treg/Th1.
- El secretoma de las CEMh pretratadas con ASL no muestra propiedades antiproliferativas frente a poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ en cultivos de PBMCs.

- En conclusión el secretoma de las CEMh pretratadas con ASL muestra características antiinflamatorias, que sugieren un promisorio uso como tratamiento para las úlceras de *Leishmania braziliensis*.

## IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda estudiar otras concentraciones y tiempos de estimulación del ASL, para comprender mejor la respuesta de las CEMh a este estímulo.
- Para entender mejor el estrés causado por la estimulación con el ASL se recomienda realizar estudios complementarios de marcadores de estrés y apoptosis.
- Se recomienda considerar nuevos tiempos de recolección del secretoma, así como técnicas de concentración de este, para potenciar el perfil del secretoma producto de la estimulación.
- Se recomienda trabajar con secretoma fresco y en el caso sea liofilizado concentrarlo.
- Para una mejor caracterización del secretoma se recomienda también caracterizar otros componentes de este como los microARNs y las microvesículas, lo que permitiría complementar la información sobre el perfil inmunomodulador de los secretomas de ASL y LPS.
- Se recomienda evaluar en otras poblaciones celulares el efecto inmunomodulador del secretoma *in vitro*. Cultivos de monocitos/macrófagos o neutrófilos, los cuales cumplen un papel clave en la respuesta inmune en las úlceras de *L. braziliensis*.
- Se recomienda evaluar la capacidad regenerativa y antiparasitaria del secretoma pretratado con ASL para comprender mejor el potencial terapéutico.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 7, pp. 499–511). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., & Khoury, M. (2017). Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: Current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00339>
- Andersen, E. M., Cruz-Saldarriaga, M., Llanos-Cuentas, A., Luz-Cjuno, M., Echevarria, J., Miranda-Verastegui, C., Colina, O., & Berman, J. D. (2005). Comparison of Meglumine Antimoniate and Pentamidine for Peruvian Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 72(2), 133–137.
- Bahrani, S., Safari, M., Razi Jalali, M. H., Ghorbanpoor, M., Tabandeh, M. R., & Rezaie, A. (2021). The potential therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major* in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108063>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells state-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 18(3), e264–e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Brinkhof, B., Zhang, B., Cui, Z., Ye, H., & Wang, H. (2020). ALCAM (CD166) as a gene expression marker for human mesenchymal stromal cell characterisation. *Gene: X*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.100031>

- Cao, Y., Gang, X., Sun, C., & Wang, G. (2017). Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. In *Journal of Diabetes Research* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/9328347>
- Carvalho, A. M., Bacellar, O., & Carvalho, E. M. (2022). Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. In *Pathogens* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040466>
- CDC-MINSA. (2021). Boletín epidemiológico *Leishmania* 2021. In *Casos de leishmania, Perú* (pp. 1–2).
- Dameshghi, S., Zavarán-Hosseini, A., Soudi, S., Shirazi, F. J., Nojehdehi, S., & Hashemi, S. M. (2016). Mesenchymal stem cells alter macrophage immune responses to *Leishmania major* infection in both susceptible and resistance mice. *Immunology Letters*, *170*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.12.002>
- de Oliveira, C. I., & Brodskyn, C. I. (2012). The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00145>
- Deng, H., Sun, C., Sun, Y., Li, H., Yang, L., Wu, D., Gao, Q., & Jiang, X. (2018). Lipid, Protein, and MicroRNA Composition Within Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cellular Reprogramming*, *20*(3), 178–186. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0047>
- Dinc, R. (2022). New developments in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *15*(5), 196. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.345944>

- 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(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Elamir, M., Hegazy, F., Hamed, A. R., Mohamed, T., & Pare, P. (2015). Anti-Inflammatory Sesquiterpenes from the Medicinal Herb *Tanacetum sinaicum* Cytotoxic compounds View project Biochemistry View project. *RSC Advances*, 0, 1–3. <https://doi.org/10.1039/C5RA07511>
- Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>
- Fathi-Kazerooni, M., Fattah-Ghazi, S., Darzi, M., Makarem, J., Nasiri, R., Salahshour, F., Dehghan-Manshadi, S. A., & Kazemnejad, S. (2022). Safety and efficacy study of allogeneic human menstrual blood stromal cells secretome to treat severe COVID-19 patients: clinical trial phase I & II. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02771-w>
- Franke, E. D., Llanos-Cuentas, A., Echevarria, J., Cruz, M. E., Campos, P., Tovar, A. A., Lucas, C. M., & Berman, J. D. (1994). Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(1), 77–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.77>

- Glenn, J. D. (2014). Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), 526. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.526>
- Ha, D. H., Kim, H. K., Lee, J., Kwon, H. H., Park, G. H., Yang, S. H., Jung, J. Y., Choi, H., Lee, J. H., Sung, S., Yi, Y. W., & Cho, B. S. (2020). Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051157>
- Hosseini, S., Taghiyar, L., Safari, F., & Baghaban Eslaminejad, M. (2018). Regenerative medicine applications of mesenchymal stem cells. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1089, pp. 115–141). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2018\\_213](https://doi.org/10.1007/5584_2018_213)
- Ibrahim, I. C., de Assis, R. R., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Melo, M. N., Turco, S. J., & Soares, R. P. (2013). Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites and Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-54>
- Ikeogu, N. M., Akaluka, G. N., Edechi, C. A., Salako, E. S., Onyilagha, C., Barazandeh, A. F., & Uzonna, J. E. (2020). *Leishmania* immunity: Advancing immunotherapy and vaccine development. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 8, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081201>
- Ivanova, G., Pereira, T., Caseiro, A. R., Georgieva, P., & Maurício, A. C. (2016). Metabolomic and Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells'

Secretome. In *Metabolomics - Fundamentals and Applications*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/66101>

Kato, H., Cáceres, A. G., Seki, C., García, C. R. S., Mauricci, C. H., Martínez, S. C. C., Paico, D. M., Muniz, J. L. C., Rivera, L. D. T., Briones, Z. I. V., Quincho, S. G., Jayo, G. L. S., Villafuerte, E. T., Estrada, C. M. de L., Arias, F. R., Passara, F. S., Llerena, N. R., Kubo, M., Tabbabi, A., ... Hashiguchi, Y. (2019). Further insight into the geographic distribution of leishmania species in Peru by cytochrome b and mannose phosphate isomerase gene analyses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007496>

Ke, C., Chen, J., Guo, Y., Chen, Z. W., & Cai, J. (2015). Migration mechanism of mesenchymal stem cells studied by QD/NSOM. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(3), 859–868.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.013>

Kehl, D., Generali, M., Mallone, A., Heller, M., Uldry, A. C., Cheng, P., Gantenbein, B., Hoerstrup, S. P., & Weber, B. (2019). Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *Npj Regenerative Medicine*, 4(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41536-019-0070-y>

Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. In *Dermatologic Clinics* (Vol. 33, Issue 3, pp. 579–593). W.B. Saunders.  
<https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

- Khosrowpour, Z., Hashemi, S. M., Mohammadi-Yeganeh, S., & Souidi, S. (2017). Pretreatment of Mesenchymal Stem Cells With *Leishmania major* Soluble Antigens Induce Anti-Inflammatory Properties in Mouse Peritoneal Macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*(9), 2764–2779. <https://doi.org/10.1002/jcb.25926>
- Kim, N., & Cho, S. G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. In *Korean Journal of Internal Medicine* (Vol. 28, Issue 4, pp. 387–402). <https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.4.387>
- Kleiveland, C., & Kleiveland, C. (2015). Peripheral blood mononuclear cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 161–167). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15)
- Kurte, M., Vega-Letter, A. M., Luz-Crawford, P., Djouad, F., Noël, D., Khoury, M., & Carrión, F. (2020). Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE. *Stem Cell Research and Therapy*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01840-2>
- Lee, S. G., & Joe, Y. A. (2018). Autophagy mediates enhancement of proangiogenic activity by hypoxia in mesenchymal stromal/stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *501*(4), 941–947. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.086>
- Levy, O., Kuai, R., Siren, E. M. J., Bhere, D., Milton, Y., Nissar, N., de Biasio, M., Heinelt, M., Reeve, B., Abdi, R., Alturki, M., Fallatah, M., Almalik, A.,

- Alhasan, A. H., Shah, K., & Karp, J. M. (2020). Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Science Advances*, 6(eaba6884).
- Lim, J., Lee, S., Ju, H., Kim, Y., Heo, J., Lee, H. Y., Choi, K. C., Son, J., Oh, Y. M., Kim, I. G., & Shin, D. M. (2017). Valproic acid enforces the priming effect of sphingosine-1 phosphate on human mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 739–747. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3053>
- Lin, T., Pajarinen, J., Nabeshima, A., Lu, L., Nathan, K., Jämsen, E., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2017). Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0730-z>
- Llanos-Cuentas, A., Tulliano, G., Araujo-Castillo, R., Miranda-Verastegui, C., Santamaria-Castrellon, G., Ramirez, L., Lazo, M., de Doncker, S., Boelaert, M., Robays, J., Dujardin, J. C., Arevalo, J., & Chappuis, F. (2008). Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 223–231. <https://doi.org/10.1086/524042>
- 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. In *International Journal of Stem Cells* (Vol. 12, Issue 2, pp. 218–226). Sungkyunkwan University. <https://doi.org/10.15283/ijsc18034>

- Masmoudi, A., Maalej, N., Mseddi, M., Souissi, A., Turki, H., Boudaya, S., Bouassida, S., & Zahaf, A. (2005). Glucantime® par voie parentérale: Bénéfice versus toxicité. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 35(1), 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2004.07.032>
- Mei, Y. B., Zhou, W. Q., Zhang, X. Y., Wei, X. J., & Feng, Z. C. (2013). Lipopolysaccharides shapes the human wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(2), 390–401. <https://doi.org/10.1159/000354446>
- MINSA. (2000). Leishmaniasis. In *B: Vol. I*.
- Miyagawa, I., Nakayamada, S., Nakano, K., Yamagata, K., Sakata, K., Yamaoka, K., & Tanaka, Y. (2017). Induction of Regulatory T Cells and Its Regulation with Insulin-like Growth Factor/Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4 by Human Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 199(5), 1616–1625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600230>
- Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 81, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
- Najar, M., Krayem, M., Merimi, M., Burny, A., Meuleman, N., Bron, D., Raicevic, G., & Lagneaux, L. (2018). Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. In *Inflammation Research* (Vol. 67, Issue 6, pp. 467–477). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1131-1>
- Navard, S. H., Rezvan, H., Haddad, M. H. F., Ali, S. A., Nourian, A., Eslaminejad, M. B., & Behmanesh, M. A. (2020a). Therapeutic effects of mesenchymal

- stem cells on cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania major*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.005>
- Navard, S. H., Rezvan, H., Haddad, M. H. F., Ali, S. A., Nourian, A., Eslaminejad, M. B., & Behmanesh, M. A. (2020b). Therapeutic effects of mesenchymal stem cells on cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania major*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.005>
- Noronha Nc, N. D. C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J. G., Rocha, J. L. M., Covas, D. T., Swiech, K., & Malmegrim, K. C. R. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>
- Nylén, S., & Eidsmo, L. (2012). Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. In *Parasite Immunology* (Vol. 34, Issue 12, pp. 551–561). <https://doi.org/10.1111/pim.12007>
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. v., Marzochi, M. C., & Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. In *Acta Tropica* (Vol. 118, Issue 2, pp. 87–96). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>
- OMS. (2022). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

- Oshita, K., Yamaoka, K., Udagawa, N., Fukuyo, S., Sonomoto, K., Maeshima, K., Kurihara, R., Nakano, K., Saito, K., Okada, Y., Chiba, K., & Tanaka, Y. (2011). Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis and Rheumatism*, *63*(6), 1658–1667. <https://doi.org/10.1002/art.30309>
- Palumbo, S., & Li, W. J. (2013). Osteoprotegerin enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part A*, *19*(19–20), 2176–2187. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0550>
- Pereira, J. C., Ramos, T. D., Silva, J. D., de Mello, M. F., Pratti, J. E. S., da Fonseca-Martins, A. M., Firmino-Cruz, L., Kitoko, J. Z., Chaves, S. P., de Oliveira Gomes, D. C., Diaz, B. L., Rocco, P. R. M., & de Matos Guedes, H. L. (2017). Effects of bone marrow mesenchymal stromal cell therapy in experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice induced by leishmania amazonensis. *Frontiers in Immunology*, *8*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00893>
- Polari, L. P., Carneiro, P. P., Macedo, M., Machado, P. R. L., Scott, P., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2019). Leishmania braziliensis infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers TNF- $\alpha$  and IL-10 production in human cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*(MAY). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00120>
- Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Treatment options for leishmaniasis. In *Clinical and Experimental Dermatology* (Vol. 47, Issue 3, pp. 516–521). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>

- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009016>
- Praveen, K., Kandoi, S., Misra, R., S., V., K., R., & Verma, R. S. (2019). The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 46, pp. 1–9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
- Raicevic, G., Rouas, R., Najar, M., Stordeur, P., Id Boufker, H., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevessignsky, M. T., & Lagneaux, L. (2010). Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Human Immunology*, 71(3), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.12.005>
- Ramos, T. D., Silva, J. D., da Fonseca-Martins, A. M., da Silveira Pratti, J. E., Firmino-Cruz, L., Maciel-Oliveira, D., Dos-Santos, J. S., Tenorio, J. I. N., de Araujo, A. F., Freire-De-Lima, C. G., Diaz, B. L., Cruz, F. F., Rocco, P. R. M., & de Matos Guedes, H. L. (2020). Combined therapy with adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells and meglumine antimoniate controls lesion development and parasite load in murine cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01889-z>
- Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S., & Jeong, J. H. (2019). Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges,

opportunities, and future perspectives. In *European Journal of Cell Biology* (Vol. 98, Issues 5–8). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2019.04.002>

Rojas-Bernabé, A., Garcia-Hernández, O., Maldonado-Bernal, C., Delegado-Dominguez, J., Ortega, E., Gutiérrez-Kobeh, L., Becker, I., & Aguirre-Garcia, M. (2014). Leishmania mexicana lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology*, *141*(6), 788–800. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002187>

Salehinejad, P., Alitheen, N. B., Nematollahi-Mahani, S. N., Ali, A. M., Omar, A. R., Janzamin, E., & Hajghani, M. (2012). Effect of culture media on expansion properties of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Cytotherapy*, *14*(8), 948–953. <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.684377>

Samir, W., Llalle, C., Cubas, W. S., Centeno-Leguía, D., Arteaga-Livias, K., & Depaz-López, E. (2018). Revisión clínica y epidemiológica de la leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. *Epidemiología*. [www.revinf.cl](http://www.revinf.cl)

Sanchez-Castro, E. E., Pajuelo-Reyes, C., Tejedo, R., Soria-Juan, B., Tapia-Limonchi, R., Andreu, E., Hitos, A. B., Martin, F., Cahuana, G. M., Guerra-Duarte, C., de Assis, T. C. S., Bedoya, F. J., Soria, B., Chávez-Olórtegui, C., & Tejedo, J. R. (2021). Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies as Promising Treatments for Muscle Regeneration After Snakebite Envenoming. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609961>

- Sánchez-Guijo, F., García-Arranz, M., López-Parra, M., Monedero, P., Mata-Martínez, C., Santos, A., Sagredo, V., Álvarez-Avello, J. M., Guerrero, J. E., Pérez-Calvo, C., Sánchez-Hernández, M. V., Del-Pozo, J. L., Andreu, E. J., Fernández-Santos, M. E., Soria-Juan, B., Hernández-Blasco, L. M., Andreu, E., Sempere, J. M., Zapata, A. G., ... Prósper, F. (2020). Adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. A proof of concept study. *EClinicalMedicine*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100454>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 9, pp. 581–592). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Shin, S., Lee, J., Kwon, Y., Park, K. S., Jeong, J. H., Choi, S. J., Bang, S. I., Chang, J. W., & Lee, C. (2021). Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and wharton's jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Tabbabi, A., Cáceres, A. G., Bustamante Chauca, T. P., Seki, C., Choochartpong, Y., Mizushima, D., Yamamoto, D. S., Hashiguchi, Y., & Kato, H. (2020). Nuclear and kinetoplast dna analyses reveal genetically complex leishmania strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Peru. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008797>
- Teixeira, F., & Salgado, A. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: Current trends and future challenges. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 15, Issue

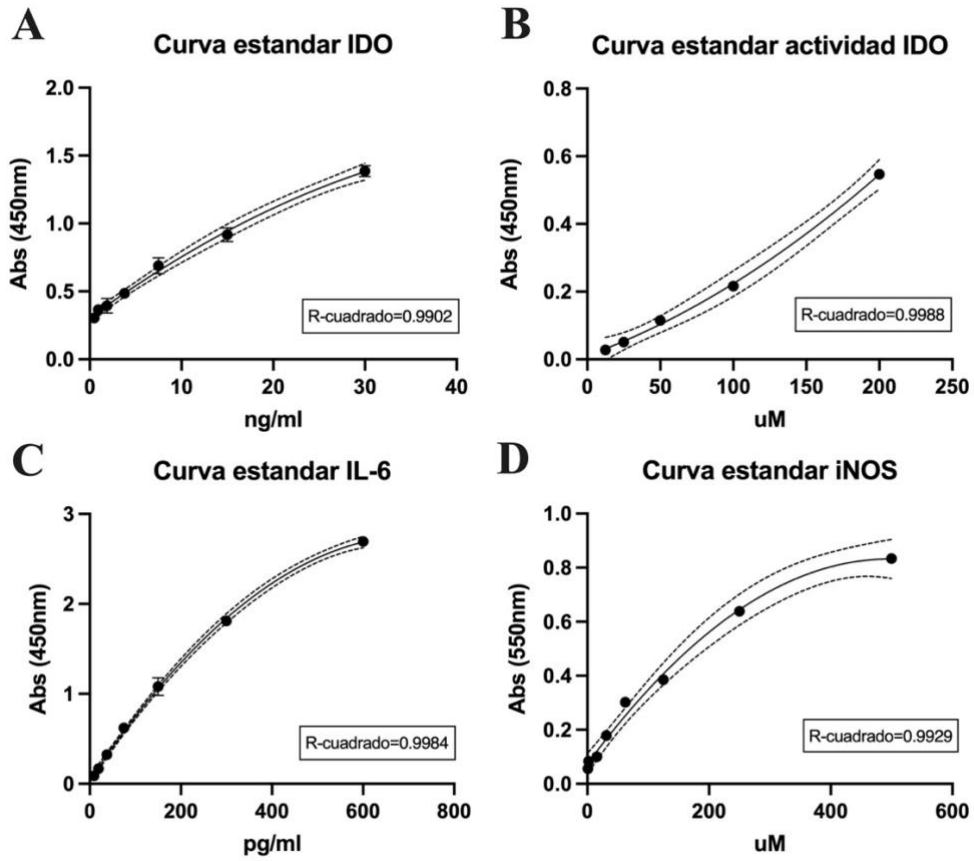
- 1, pp. 75–77). Wolters Kluwer Medknow Publications.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.264455>
- Tuon, F. F., Fernandes, E. R., Duarte, M. I. S., & Amato, V. S. (2012). Expressão de TLR2 e TLR4 em lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 54(3), 159–163. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000300008>
- Vallabhaneni, K. C., Penfornis, P., Dhule, S., Guillonneau, F., Adams, K. v, Yuan Mo, Y., Xu, R., Liu, Y., Watabe, K., Vemuri, M. C., & Pochampally, R. (2014). Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/ stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. In *Oncotarget* (Vol. 6, Issue 7). [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
- Venugopal, P., Balasubramanian, S., Majumdar, A. sen, & Ta, M. (2011). Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 4(1), 39–50. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S17548>
- Vieira, T. da S., Rugani, J. N., Nogueira, P. M., Torrecilhas, A. C., Gontijo, C. M. F., Descoteaux, A., & Soares, R. P. (2019). Intraspecies polymorphisms in the lipophosphoglycan of *L. braziliensis* differentially modulate macrophage activation via TLR4. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00240>
- Vigo, T., Procaccini, C., Ferrara, G., Baranzini, S., Oksenberg, J. R., Matarese, G., Diaspro, A., Kerlero de Rosbo, N., & Uccelli, A. (2017). IFN- $\gamma$  orchestrates mesenchymal stem cell plasticity through the signal transducer and activator

- of transcription 1 and 3 and mammalian target of rapamycin pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5), 1667–1676. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.004>
- Wang, Q., Yang, Q., Wang, Z., Tong, H., Ma, L., Zhang, Y., Shan, F., Meng, Y., & Yuan, Z. (2016). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton’s jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(1), 85–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1030549>
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 203). [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
- Zanganeh, E., Soudi, S., & Hosseini, A. Z. (2020). Intralesional Injection of Mouse Mesenchymal Stem Cells Reduces IL-10 Production and Parasite Burden in L. major Infected BALB/c Mice. *Cell Journal*, 22, 11–18. <https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6838>
- Zhou, R., Diehl, D., Hoeflich, A., Lahm, H., & Wolf, E. (2003). REVIEW IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 178). <http://www.endocrinology.org>
- Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., Demetriou, A., & Wu, G. D. (2006). The Role of the Hyaluronan Receptor

CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix. *Stem Cells*, 24(4), 928–935. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0186>

## XI. ANEXOS

### Anexo 1. Curvas estándares de los ensayos colorimétricos realizados



**Anexo 2.** Cinética de crecimiento del cultivo de CEMh. Evaluación del tiempo de duplicación (Td) y el doblaje acumulativo poblacional (DAP) a lo largo de los pases

<b>Pase</b>	<b>Tiempo de duplicación (n=3)</b>		<b>Doblaje Acumulativo Poblacional (n=3)</b>	
	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
Pase 1 (7 días)	61.387	0.577	2.720	0.001
Pase 2 (14 días)	65.163	0.150	5.155	0.007
Pase 3 (21 días)	64.280	3.738	7.770	0.226
Pase 4 (28 días)	60.333	0.577	10.570	0.226
Pase 5 (35 días)	65.850	0.658	12.780	0.198

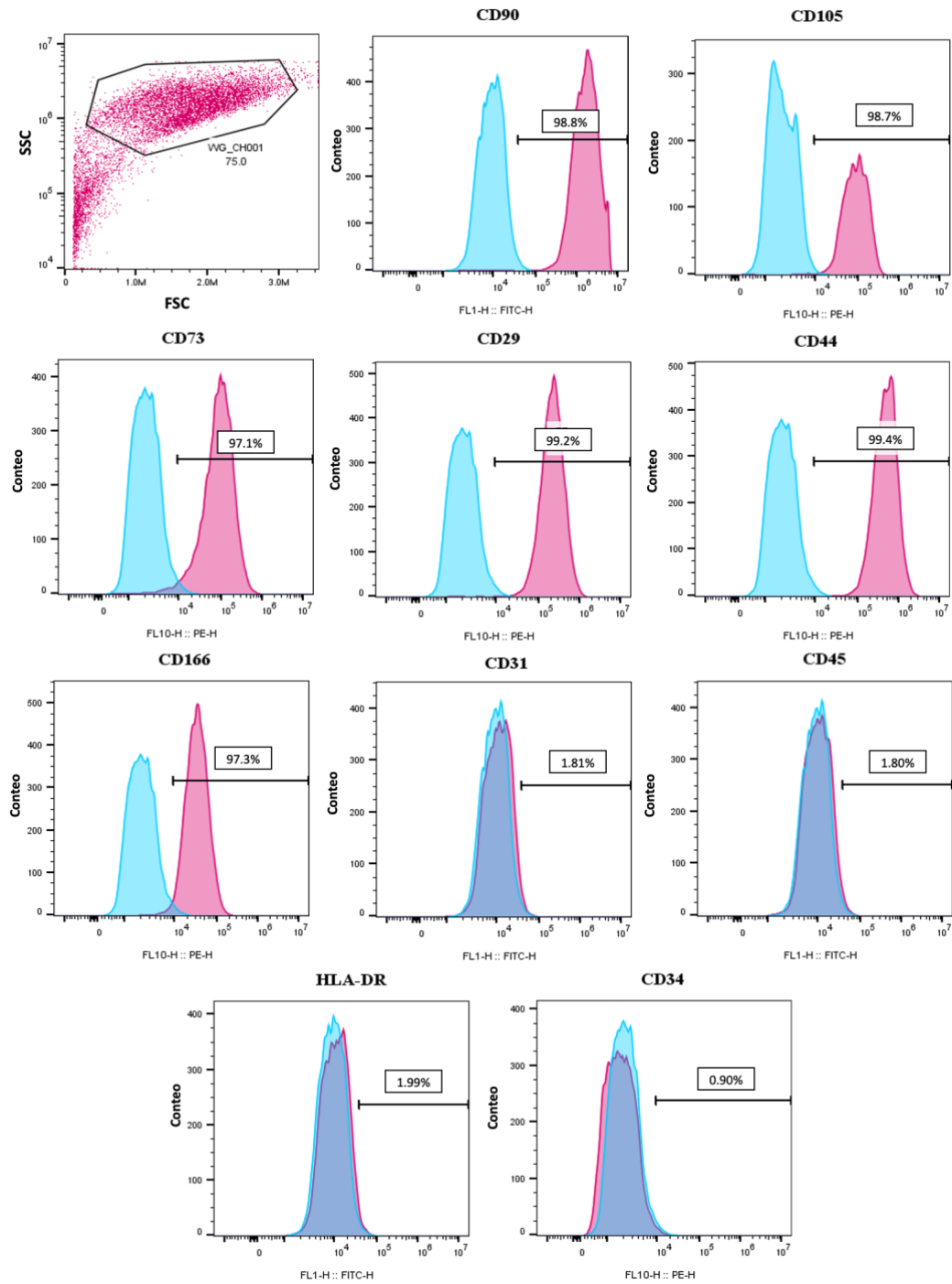
DE: Desviación estándar

**Anexo 3.** Caracterización inmunofenotípica del cultivo a lo largo de los pases 3-5

<b>Marcador</b>	<b>Pase 3 (%)</b>	<b>Pase 4 (%)</b>	<b>Pase 5 (%)</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
<b>CD90 (+)</b>	98.90	98.80	99.30	99.00	0.26
<b>CD73 (+)</b>	98.80	97.10	97.30	97.73	0.93
<b>CD105 (+)</b>	99.30	98.70	98.00	98.67	0.65
<b>CD29 (+)</b>	99.10	99.20	99.60	99.30	0.26
<b>CD166 (+)</b>	97.40	97.30	97.70	97.47	0.21
<b>CD44 (+)</b>	99.30	99.40	99.50	99.40	0.10
<b>CD45 (-)</b>	2.00	1.80	1.75	1.85	0.13
<b>CD34 (-)</b>	0.80	0.90	0.52	0.74	0.20
<b>HLA-DR (-)</b>	1.97	1.72	1.99	1.90	0.15
<b>CD31 (-)</b>	1.81	1.81	1.96	1.86	0.09

(+) Marcador positivo para CEM (-) Marcador negativo para CEM DE: Desviación estándar

**Anexo 4.** Gráficos representativos del análisis por citometria de flujo de la caracterización inmunofenotípica. Las gráficas corresponden al pase 4, utilizado para el pretratamiento. En celeste se representa los respectivos controles de isotipo y en fucsia la muestra evaluada para el marcador.



SSC: Complejidad o granulosidad celular FSC: Tamaño celular

**Anexo 5.** Cuantificación de la cantidad en ug proteínas/ml y ug deproteínas /mil células en los secretomas obtenidos. Se representa el promedio de tres experimentos independientes de obtención del secretoma.

		ug/ml	Promedio	DE	P-value*	ug/ml células	Promedio	DE	P-value*
<b>Control</b>	<b>R1</b>	67.3	69.5	2.30		2.45	2.47	0.26	
	<b>R2</b>	69.5				2.22			
	<b>R3</b>	71.9				2.74			
<b>ASL 10ug/ml</b>	<b>R1</b>	64.7	65.4	1.04	0.3032	2.46	2.42	0.05	>0.999
	<b>R2</b>	66.6				2.42			
	<b>R3</b>	64.9				2.36			
<b>LPS 10ug/ml</b>	<b>R1</b>	62.1	63.6	2.26	0.0512	2.37	2.46	0.08	>0.999
	<b>R2</b>	62.5				2.50			
	<b>R3</b>	66.2				2.52			

Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. R1, R2, R3: Experimentos independientes de obtención de secretoma. DE: desviación estándar. \*Prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis y comparación múltiple de Dunn

**Anexo 6.** Evaluación semicuantitativa de la expresión de citoquinas mediante un panel de 80 blancos. Los valores se representan en intensidad de señal y log (intensidad de señal). Asimismo se representa la expresión relativa frente al secretoma control y el log2 de la expresión relativa.

Citoquina	Intensidad de señal			Log(IS)			ER		Log2(ER)	
	Control	ASL	LPS	Control	ASL	LPS	ASL	LPS	ASL	LPS
<b>ENA-78</b>	3328.38	3220.65	0	3.52	3.51	0.00	0.97	0.00	-0.05	0.00
<b>GCSF</b>	2905.57	2246.16	0	3.46	3.35	0.00	0.77	0.00	-0.37	0.00
<b>GM-CSF</b>	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>GRO</b>	12028.08	7796.1	312.7	4.08	3.89	2.50	<b>0.65</b>	<b>0.03</b>	<b>-0.63</b>	<b>-5.27</b>
<b>GRO-a</b>	12872.19	7508.46	1424.88	4.11	3.88	3.15	<b>0.58</b>	<b>0.11</b>	<b>-0.78</b>	<b>-3.18</b>
<b>I-309</b>	0	2731.32	5152.95	0.00	3.44	3.71	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IL-1a</b>	0	1550.82	4699.62	0.00	3.19	3.67	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IL-1b</b>	0	254.81	2755.08	0.00	2.41	3.44	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IL-2</b>	0	0	1849.85	0.00	0.00	3.27	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IL-3</b>	1257.22	0	719.26	3.10	0.00	2.86	0.00	0.57	0.00	-0.81
<b>IL-4</b>	1002.41	1050.62	155.42	3.00	3.02	2.19	1.05	0.16	0.07	-2.69
<b>IL-5</b>	3888.47	2584.92	0	3.59	3.41	0.00	<b>0.66</b>	0.00	<b>-0.59</b>	0.00
<b>IL-6</b>	59259.61	47679.68	36869.49	4.77	4.68	4.57	<b>0.80</b>	<b>0.62</b>	<b>-0.31</b>	<b>-0.68</b>
<b>IL-7</b>	2702.75	1886.34	0	3.43	3.28	0.00	<b>0.70</b>	0.00	<b>-0.52</b>	0.00
<b>IL-8</b>	28923.44	20995.34	10698.04	4.46	4.32	4.03	<b>0.73</b>	<b>0.37</b>	<b>-0.46</b>	<b>-1.43</b>
<b>IL-10</b>	3780.81	1202.89	0	3.58	3.08	0.00	<b>0.32</b>	0.00	<b>-1.65</b>	0.00
<b>IL-12</b>	0	1635.99	3866.2	0.00	3.21	3.59	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IL-13</b>	0	1555.06	4674.58	0.00	3.19	3.67	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IL-15</b>	0	0	2180.58	0.00	0.00	3.34	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>IFN-g</b>	0	0	1874.54	0.00	0.00	3.27	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>MCP-1</b>	30169.9	23700.97	27041.66	4.48	4.37	4.43	0.79	0.90	-0.35	-0.16
<b>MCP-2</b>	1882.92	664.22	1132.45	3.27	2.82	3.05	0.35	0.60	-1.50	-0.73
<b>MCP-3</b>	3541.14	1539.86	92.85	3.55	3.19	1.97	<b>0.43</b>	<b>0.03</b>	<b>-1.20</b>	<b>-5.25</b>
<b>MSCF</b>	6257.74	3036.02	0	3.80	3.48	0.00	<b>0.49</b>	0.00	<b>-1.04</b>	0.00
<b>MDC</b>	1702.41	757.81	0	3.23	2.88	0.00	0.45	0.00	-1.17	0.00
<b>MIG</b>	2416.82	970.54	0	3.38	2.99	0.00	0.40	0.00	-1.32	0.00
<b>MIP-1b</b>	3919.2	1031.77	0	3.59	3.01	0.00	<b>0.26</b>	0.00	<b>-1.93</b>	0.00
<b>MIP-1s</b>	0	609.54	2737.09	0.00	2.78	3.44	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>RANTES</b>	0	0	1715.54	0.00	0.00	3.23	0.00	0.00	0.00	0.00



<b>MCP-4</b>	20.63	0	0	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>MIF</b>	1062.3	0	0	3.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>MIF-3a</b>	1717.94	0	0	3.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>NAP-2</b>	2242.36	0	0	3.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>NT-3</b>	4094.38	2342.38	0	3.61	3.37	0.00	<b>0.57</b>	0.00	<b>-0.81</b>	0.00
<b>NT-4</b>	0	76.82	1811.97	0.00	1.89	3.26	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Osteopontin</b>	0	0	3300.16	0.00	0.00	3.52	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Osteoprotegeri</b>	1669.77	3583.26	5699.09	3.22	3.55	3.76	<b>2.15</b>	<b>3.41</b>	<b>1.10</b>	<b>1.77</b>
<b>PARC</b>	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>PIGF</b>	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>TGF-b2</b>	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>TGF-b3</b>	135.53	0	0	2.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>TIMP-1</b>	5788.66	0	1890.4	3.76	0.00	3.28	0.00	<b>0.33</b>	0.00	<b>-1.61</b>
<b>TIMP-2</b>	27307.67	15774.05	16134.87	4.44	4.20	4.21	<b>0.58</b>	<b>0.59</b>	<b>-0.79</b>	<b>-0.76</b>

Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: 10ug/ml de Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: 10ug/ml

de Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. IS: Intensidad de señal. ER: Expresión relativa.

**Negrita:**Valores mas respresentativos de cambios de expresión

**Anexo 7.** Evaluación cuantitativa de la expresión de citoquinas en los secretomas de CEMh de gelatina de Wharton. Se representa el promedio de tres experimentos independientes de obtención del secretoma.

<b>Citoquina</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Promedio (n=3)</b>	<b>DE (n=3)</b>	<b>P-value</b>
<b>IDO (ng/ml)</b>	<b>Control</b>	0.396	0.054	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	0.164	0.015	<b>0.0121*</b>
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	0.319	0.108	0.4104
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	<b>Control</b>	200.3	66.39	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	178.6	27.90	0.7477
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	97.86	14.20	<b>0.0371*</b>
<b>L-kinurenina (uM)</b>	<b>Control</b>	15.80	3.41	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	8.80	0.21	<b>0.0492*</b>
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	20.17	1.95	0.2128
<b>iNOS (uM)</b>	<b>Control</b>	32.07	1.09	<b>0.008**</b>
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	27.80	0.27	<b>0.007**</b>
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	36.37	1.16	<b>&lt;0.001***</b>

Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. DE: desviación estándar. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis y comparación múltiple de Dunn \*p-value<0.05 \*\*p-value<0.01 \*\*\*p-value<0.001

**Anexo 8.** Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los secretomas en PBMCs de 3 voluntarios. Se presenta el promedio de 3 replicas por voluntario.

<b>Población o subpoblación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>V1 (n=3)</b>	<b>V2 (n=3)</b>	<b>V3 (n=3)</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>P-value (vs DMEM)</b>	<b>P-value (vs Control)</b>
<b>CD4+/ CD8+</b>	<b>-PHA</b>	1.47	2.07	2.47	2.00	0.50		
	<b>+PHA</b>	1.06	2.36	2.82	2.08	0.91		
	<b>DMEM</b>	0.94	2.21	2.51	1.89	0.83		
	<b>Control</b>	0.99	2.1	2.6	1.90	0.82	>0.999	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	0.99	2.23	2.76	1.99	0.90	0.2390	0.6831
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	1.07	2.22	2.69	1.99	0.83	0.3467	0.9284
<b>CD4+</b>	<b>-PHA</b>	34	37.6	39.2	36.93	2.66		
	<b>+PHA</b>	34.9	48.4	51.4	44.90	8.79		
	<b>DMEM</b>	33.9	49.2	52.8	45.30	10.04		
	<b>Control</b>	34.87	48.4	51.4	44.89	8.81	>0.999	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	34.57	47.83	52.63	45.01	9.35	>0.999	>0.999
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	35.93	48.7	52.4	45.68	8.64	>0.999	>0.999
<b>CD8+</b>	<b>-PHA</b>	23.2	18.2	15.9	19.10	3.73		
	<b>+PHA</b>	33	20.5	18.2	23.90	7.96		
	<b>DMEM</b>	36	22.3	21	26.43	8.31		
	<b>Control</b>	35.3	23	19.77	26.02	8.19	>0.999	

	<b>ASL (10ug/ml)</b>	34.93	21.43	19.07	25.14	8.56	0.1611	0.3467
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	33.7	21.9	19.47	25.02	7.61	0.3467	0.6831
<b>Th1 (CD4+ INF<math>\gamma</math>)</b>	<b>-PHA</b>	0.85	0.2	0.51	0.52	0.33		
	<b>+PHA</b>	2.47	3.15	1.7	2.43	1.02		
	<b>DMEM</b>	2.5	2.99	1.71	2.45	0.91		
	<b>Control</b>	2.8	3.28	2.35	2.81	0.65	0.7280	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	2.43	2.67	2.15	2.41	0.37	>0.999	0.7280
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	2.5	2.9	2.04	2.47	0.61	>0.999	0.7280
<b>Treg (CD25+ FOXP3+)</b>	<b>-PHA</b>	0.54	0.43	0.19	0.39	0.18		
	<b>+PHA</b>	1.86	2.53	1.43	1.98	0.78		
	<b>DMEM</b>	1.82	2.43	1.18	1.81	0.88		
	<b>Control</b>	1.61	2.1	1.08	1.59	0.72	>0.999	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	1.52	1.83	1.26	1.54	0.40	>0.999	>0.999
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	1.54	1.98	1.13	1.55	0.60	>0.999	>0.999
<b>Treg/Th1</b>	<b>-PHA</b>	0.64	1.15	0.37	0.72	0.39		
	<b>+PHA</b>	0.68	0.8	0.84	0.77	0.08		
	<b>DMEM</b>	0.91	0.81	0.69	0.70	0.11		
	<b>Control</b>	0.63	0.64	0.46	0.58	0.10	0.1266	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	0.64	0.73	0.59	0.65	0.07	>0.999	0.6831

	<b>LPS (10ug/ml)</b>	0.66	0.68	0.55	0.63	0.07	0.6831	>0.999
<b>CD8+INF<math>\gamma</math>+</b>	<b>-PHA</b>	2.48	0.48	0.96	1.31	1.04		
	<b>+PHA</b>	4.61	3.67	1.34	3.21	1.68		
	<b>DMEM</b>	3.76	3.28	3.73	3.59	0.27		
	<b>Control</b>	4.7	3.9	2.37	3.66	1.18	>0.999	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	3.45	3.15	2.18	2.93	0.66	0.3467	0.1611
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	3.58	3.62	2.42	3.21	0.68	>0.999	>0.999

V: Voluntario, +PHA: con fitohemaglutinina, -PHA: sin PHA, DMEM: medio base de recolección de los secretomas. Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. DE: desviación estándar. Prueba estadística no paramétrica de Friedman para muestras pareadas y comparación múltiple de Dunn \*p-value<0.05 \*\*p-value<0.01 \*\*\*p-value<0.001

**Anexo 9.** Evaluación de la capacidad antiproliferativa de los secretomas en PBMCs de 3 voluntarios. Se presenta el promedio de 3 replicas por voluntario.

	Tratamiento	V1 (n=3)	V2 (n=3)	V3 (n=3)	Promedio	DE	P-value (vs DMEM)	P-value (vs Control)
<b>% PROLIFE RACIÓN CD4+</b>	<b>-PHA</b>	0.3	0.38	0.33	0.34	0.04		
	<b>+PHA</b>	63.8	68.6	73.4	68.60	4.80		
	<b>DMEM</b>	62.5	69.9	74.3	68.90	5.96		
	<b>Control</b>	67.53	71.3	76.2	71.68	4.35	0.3467	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	66.43	71.93	77.07	71.81	5.32	0.0685	>0.999
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	66.03	71.07	76.6	71.23	5.29	>0.999	>0.999
<b>IP CD4+</b>	<b>+PHA</b>	1.49	1.51	1.37	1.46	0.07		
	<b>DMEM</b>	1.47	1.48	1.31	1.42	0.09		
	<b>Control</b>	1.52	1.52	1.41	1.48	0.06	0.1431	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	1.5	1.49	1.39	1.46	0.06	>0.999	0.6831
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	1.5	1.52	1.4	1.47	0.06	0.3467	>0.999
<b>% PRO CD8+</b>	<b>-PHA</b>	0.35	0.3	0.38	0.34	0.04		
	<b>+PHA</b>	68.6	54.5	78.5	67.20	12.06		
	<b>DMEM</b>	68.2	55.6	82.1	68.63	13.26		
	<b>Control</b>	71.67	54.03	80.17	68.62	13.33	>0.999	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	73.2	55.87	78.23	69.10	11.73	>0.999	>0.999

	<b>LPS (10ug/ml)</b>	69.07	51.47	78.53	66.36	13.73	>0.999	>0.999
<b>IP CD8+</b>	<b>+PHA</b>	2.61	1.91	1.65	2.06	0.49		
	<b>DMEM</b>	2.62	1.92	1.6	2.05	0.52		
	<b>Control</b>	2.68	1.9	1.73	2.10	0.50	>0.999	
	<b>ASL (10ug/ml)</b>	2.71	1.9	1.68	2.09	0.54	>0.999	0.9284
	<b>LPS (10ug/ml)</b>	2.61	1.87	1.69	2.06	0.48	>0.999	>0.999

V:Voluntario, +PHA: con fitohemaglutinina, -PHA: sin PHA, DMEM: medio base de recolección de los secretomas. Control: Secretoma sin pretratamiento, LPS: Lipopolisacárico de *E.coli*, ASL: Antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. DE: desviación estándar. Prueba estadística no paramétrica de Friedman para muestras pareadas y comparación múltiple de Dunn \*p-value<0.05  
\*\*p-value<0.01 \*\*\*p-value<0.001

