



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación *In vitro* de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

Leidi Yohana Méndez Báez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Maestría en Ciencias Microbiología
Bogotá, Colombia
2020

Evaluación *In vitro* de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

Leidi Yohana Méndez Báez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Microbiología

Director:

MD., PhD, Gustavo Andrés Salguero López

Codirector:

PhD, José Manuel Lozano Moreno

Grupo de Investigación:

Unidad de Terapias Avanzadas - IDCBIS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Maestría en Ciencias Microbiología

Bogotá, Colombia

2020

A Dios y a mi familia

¡Hola Sol...! Cómo me gustaría haber compartido tu largo trayecto regalando luz, porque a tu paso acariciaste la vida de mil pueblos, compartiste sus alegrías y tristezas, conociste la guerra y la paz, impulsaste la oración y el trabajo, acompañaste la libertad e hiciste menos dura la oscuridad de los presidios.

Carlos Páez Vilaró

Agradecimientos

A Dios por darme la sabiduría y fortaleza para culminar esta etapa de mi vida.

A mi papá que es la estrella más brillante del cielo, que cuida cada uno de mis pasos.

A mi amado esposo madre e hijos por ser mi pilar por darme las fuerzas necesarias para salir adelante, enseñarme que debo creer en mí y que puedo culminar todos los proyectos que me proponga.

A mi gran amiga Marian Jaime por apoyarme en los momentos más difíciles y aconsejarme de la mejor manera.

Al Doctor Gustavo Andrés Salguero López, director de mi trabajo de tesis de Maestría, por darme la oportunidad de crecer a nivel profesional en su grupo de investigación, por estar siempre dispuesto a ayudarme y brindarme su apoyo.

Al profesor José Manuel Lozano Moreno, por brindarme su confianza y motivarme para finalizar la Maestría.

A Mariana Cañas por su inmensa ayuda, por enseñarme a creer en mí y brindarme su apoyo de una forma desinteresada.

A Luz Stella Correa por compartir conmigo todo su conocimiento para que enriqueciera mi investigación.

A Astrid Malagón por facilitarme el tiempo necesario para poder desarrollar mi tesis y apoyarme en los momentos más difíciles.

Al Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS), bajo la dirección del Doctor Bernardo Camacho, quien me abrió las puertas del instituto y me brindo toda su confianza para desarrollar mi trabajo de Maestría.

Y a todas y cada una de las personas que de una u otra forma participaron en este bello proceso

A todos, mil y mil gracias.

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente de salud pública mundial y amenaza la prevención y el tratamiento eficaz de las infecciones. La investigación de estrategias alternativas apunta a la generación y uso de péptidos antimicrobianos (AMP) dado su amplio espectro de actividad antimicrobiana. Una potencial fuente de (AMP) reside en células estromales mesenquimales (CEM) humanas. Las CEM han demostrado potentes efectos terapéuticos en términos de inmunomodulación y diferenciación multilineaje y participan activamente en el control y reparación tisular. Este trabajo se enfocó en explorar el potencial efecto antimicrobiano de las CEM aisladas de gelatina de Wharton (GW) del cordón umbilical ante la infección experimental con las cepas bacterianas *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228. A partir de la exposición de inóculos bacterianos a CEM-GW se pudo observar una importante actividad antimicrobiana cuya magnitud dependió de la cepa bacteriana inoculada. Este efecto antimicrobiano observado se relacionó fuertemente con la presencia de lisado plaquetario humano (LPh). De manera importante a partir de la caracterización de la expresión de ARN mensajero y secreción de los AMPs β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hecpidina en sobrenadante, el efecto antimicrobiano de las CEM-GW se asoció significativamente al incremento de la expresión y secreción de AMPs, especialmente β -defensina-1 y Lipocalina-2. Estos resultados proveen evidencia del efecto antimicrobiano que ejercen las CEM-GW sobre las cepas bacterianas utilizadas, el cual depende de la presencia de LPh y deriva en la expresión y secreción de AMPs, como mecanismo de defensa a la infección.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, β -defensina-1, Lipocalina-2, Hecpidina, CEM-GW, cepas ATCC

Abstract

Antimicrobial resistance is a growing problem in global public health and threatens the prevention and effective treatment of infections. The investigation of alternative strategies point to the generation and use of antimicrobial peptides (AMP) given its broad spectrum of antimicrobial activity. A potential source of (AMP) resides in human mesenchymal stromal cells (MSC). MSC have demonstrated potent therapeutic effects in terms of immunomodulation and multilineage differentiation and are actively involved in tissue control and repair. This work focused on exploring the potential antimicrobial effect of MSC isolated from Wharton's jelly (GW) of the umbilical cord upon experimental infection with bacterial strains *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 and *Staphylococcus epidermidis* 12228. Experimental bacterial infection on CEM-GW triggered important antimicrobial activity whose magnitude depended on the inoculated bacterial strain. This observed antimicrobial effect depended strongly on the presence of human platelet lysate (LPh) in MSC growth media. Importantly, based on characterization of RNA expression and secretion of the AMPs β -defensin-1, Lipocalin-2 and Hecpidin in supernatant, the antimicrobial effect of CEM-GW was significantly associated with increased expression and secretion of AMPs, especially β -defensin-1 and Lipocalin-2. These results provide evidence of the antimicrobial effect that CEM-GW exerts on the bacterial strains used, which depends on the presence of LPh and results in the expression and secretion of AMPs, as a potential mechanism of defense against infection.

Keywords: Antimicrobial peptides, β -defensin-1, Lipocalin-2, Hecpidin, CEM-GW, ATCC strains

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	18
1. Objetivos.....	20
1.1 Objetivo general..	20
1.2 Objetivos específicos.....	20
2. Marco teórico y estado del arte	21
Agentes antimicrobianos y mecanismo de acción.....	21
2.2 Peptidos antimicrobianos (AMPs)	22
2.2.1 Historia y características.....	22
2.2.2 Mecanismos de acción	24
2.2.3 Defensinas.....	26
2.2.4 Hecpidina.....	27
2.2.5 Lipocalina	28
2.2.6 Potenciales aplicaciones clínicas de los AMPs	29
2.3 Células Estromales Mesenquimales (CEM)	30
2.3.1 Generalidades	30
2.3.2 Péptidos antimicrobianos y Células Estromales Mesenquimales (CEM)	34
2.3.3 Células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW).....	35
3. Materiales y métodos.....	38
3.1 Estandarización de curvas de crecimiento cepas ATCC	38
3.2 Estandarización del inóculo de cepas ATCC	39
3.3 ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922.	39
3.4 ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816	40
3.5 ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213	41
3.6 ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	42
3.7 Estandarización de cultivos e inóculo de CEM-GW	43
3.7.1 Aislamiento de CEM-GW	43
3.7.2 Caracterización inmunofenotípica de CEM-GW	44
3.7.3 Estandarización del inóculo de CEM-GW	44
3.7.4 Estandarización del cocultivo de CEM-GW con las cepas bacterianas: ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922, ATCC, <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816, <i>Staphylococcus aureus</i> 29213 y <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	45
3.8 Síntesis de primers para análisis de expresión de AMPs.....	46

3.9	Extracción y cuantificación del ARN de CEM –GW	47
3.10	Evaluación de la expresión proteica de AMPs en sobrenadantes de CEM-GW en cocultivo con cepas ATCC	48
3.11	Análisis estadístico	49
4.	Resultados y Discusión.....	50
4.1	Estandarización curvas de crecimiento cepas ATCC y determinación fase exponencial.....	50
4.2	Curvas de crecimiento cepas ATCC en DMEM Y DMEM/1%LPh	53
4.3	Aislamiento y caracterización de las CEM-GW	55
4.4	Estandarización del inóculo de cepas ATCC	56
4.5	Estandarización del cocultivo de CEM-GW con las cepas ATCC	59
4.6	Efecto de las CEM-GW en el crecimiento bacteriano de cepas ATCC	62
4.6.1	CEM-GW en cultivo con ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922	62
4.6.2	CEM-GW en cultivo con ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816	64
4.6.3	CEM-GW en cultivo con ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213	67
4.6.4	CEM-GW en cultivo con ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	69
4.7	Evaluación de las curvas de crecimiento bacteriano cepas ATCC.....	73
4.7.1	Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922 ...	73
4.7.2	Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816.....	75
4.7.3	Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213.....	76
4.7.4	Curvas de crecimiento bacteriano ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228.....	78
4.8	Evaluación de la expresión de ARN	80
4.8.1	Expresión de ARNm en ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922.	81
4.8.2	Expresión de ARNm en ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816.	84
4.8.3	Expresión de ARNm ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213	86
4.8.4	Expresión de ARNm en ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228.....	88
4.9	Expresión péptidos antimicrobianos ELISA.	92
4.9.1	Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC <i>Escherichia coli</i> 29213.....	93
4.9.2	Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94
4.9.3	Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213.	96
4.9.4	Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	98
5.	Conclusiones y recomendaciones	100
5.1	Conclusiones.....	100
5.2	Recomendaciones.....	105
	Bibliografía	107

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Mecanismos de acción de agentes antimicrobianos	1
Figura 2: Cronología de descubrimiento de AMPs.....	3
Figura 3: Mecanismos de acción de los AMPs	4
Figura 4: Estructura del AMPs defensiva.....	27
Figura 5: Modelo estructural de la hepcidina	28
Figura 6: Modelo estructural de la lipocalina.....	28
Figura 7: Representación cronológica de los descubrimientos que se han realizado con las CEM.....	31
Figura 8: Publicaciones sobre CEM en PubMed.....	33
Figura 9: Representación esquemática donde se observa cómo las CEM aisladas de médula ósea secretan diferentes AMPs	34
Figura 10: Esquema de la estructura anatómica de cordón umbilical y las (CEM-GW ...	36
Figura 11: Esquema Estandarización curvas de crecimiento cepas ATCC (1).....	38
Figura 12: Esquema Estandarización curvas de crecimiento cepas ATCC (2).....	40
Figura 13: Curva de crecimiento bacteriano <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50
Figura 14: Curva de crecimiento bacteriano <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816	51
Figura 15: Curva de crecimiento bacteriano <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	52
Figura 16: Curva de crecimiento bacteriano <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	52
Figura 17: Curva de crecimiento bacteriano <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	54
Figura 18: Esquema de aislamiento de CEM-GW de un donante usado en el presente estudio	55
Figura 19: Expresión de marcadores de superficie de las CEM.....	56
Figura 20: Ensayo preliminar de infección con <i>E coli</i> a cultivos de CEM	57
Figura 21: Recuento de UFC en 100 μ L por método de profundidad en placa	58
Figura 22: Esquema de estandarización de inoculación de CEM-GW con cepas ATCC.60	
Figura 23: Promedio de CEM-GW sembradas en cuatro ensayos independientes previa inoculación con cepas ATCC.....	61

Figura 24: CEM-GW UCWJ-85 - ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922	63
Figura 25: CEM-GW UCWJ-91 - ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922	63
Figura 26: CEM-GW UCWJ -113 - ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922	64
Figura 27: CEM-GW UCWJ -85 - ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816	65
Figura 28: CEM-GW UCWJ-91 - ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816	66
Figura 29: CEM-GW UCWJ-113 - ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816	67
Figura 30: CEM-GW UCWJ-85 - ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213	68
Figura 31: CEM-GW UCWJ -91 - ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213	68
Figura 32: CEM-GW UCWJ -113 - ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213.....	69
Figura 33: CEM-GW UCWJ -85 - ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	70
Figura 34: CEM-GW UCWJ -91 - ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228.....	71
Figura 35: CEM-GW UCWJ -113 - ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228.....	72
Figura 36: Curvas de crecimiento bacteriano <i>E. coli</i> ATCC 25922 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh..	74
Figura 37: Curvas de crecimiento bacteriano ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh.....	75
Figura 38: Curvas de crecimiento bacteriano ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh.....	77
Figura 39: Curvas de crecimiento bacteriano ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh.....	78
Figura 40: Evaluación de la expresión de ARN de HAMP, LCN2 y DEFB1 por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC <i>Escherichia coli</i> 25922.....	82
Figura 41: Expresión de ARNm de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 con y sin LPh1%.....	83
Figura 42: Evaluación de la expresión de ARN de Hepcidina, Lipocalina-2 y β 1-Defensina por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816.....	85
Figura 43: Expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816 con y sin LPh1%.....	86
Figura 44: Evaluación de la expresión de ARN de Hepcidina, Lipocalina-2 y β 1-Defensina por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213.....	87
Figura 45: Expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213 con y sin LPh1%.....	88
Figura 46: Evaluación de la expresión de ARN de Hepcidina, Lipocalina-2 y β 1-Defensina por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228.....	89
Figura 47: Expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228 con y sin LPh1%.....	91
Figura 48: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC <i>Escherichia coli</i> 29213	

con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hepsidina.....	93
Figura 49: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 43816 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina 1, Hepsidina, y Lipocalina 2.....	95
Figura 50: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 29213 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hepsidina.....	97
Figura 51: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hepsidina.....	98

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Péptidos antimicrobianos aislados en humanos.....	26
Tabla 2: Primers utilizados para PCR.....	46
Tabla 3: Resumen características expresadas por las CEM-GW en cocultivo con cepas ATCC.....	102

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
KDa	KiloDalton

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AMPs	Péptidos antimicrobianos
CEM	Células Estromales Mesenquimales
CEM-GW	Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HAMP	Hepcidina
hBD-1	β -defensina-1
IDCBIS	Instituto Distrital de Ciencias y Biotecnología e Innovación en Salud
UFC	Unidad formadora de colonia
UTA	Unidad de Terapias Avanzadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
LCN2	Lipocalina-2
LPh	Lisado Plaquetario Humano
ATCC	American Type Culture Collection

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente de salud pública mundial que requiere la acción de todos los sectores gubernamentales y la sociedad ya que amenaza la prevención y el tratamiento eficaz de las infecciones. Las consecuencias directas de la infección con microorganismos resistentes pueden ser graves, incluyendo enfermedades más prolongadas, aumento de la mortalidad e incremento en los costos hospitalarios[1]. En el año 2017 la Organización Mundial de la Salud publicó una lista de patógenos resistentes a antibióticos que se elaboró para promover las investigaciones y desarrollo de terapias alternativas, dentro de esta lista se encuentran microorganismos como la *Escherichia coli*, la *Pseudomonas aeruginosa* y el *Staphylococcus aureus* los cuales pueden provocar infecciones graves y a menudo letales [2].

Sin antimicrobianos efectivos para la prevención y el tratamiento de infecciones, los procedimientos médicos como el trasplante de órganos, la quimioterapia contra el cáncer, el tratamiento de la diabetes y la cirugía mayor se vuelven de muy alto riesgo [2]. A esto se le suma que “En Colombia los antibióticos no son completamente regulados y tanto la sociedad como el personal médico desconocen la verdadera relevancia de la resistencia bacteriana” [3].

Debido a esta problemática se ha impulsado la investigación de estrategias alternativas para el desarrollo de terapias más efectivas, una de ellas son los péptidos antimicrobianos (AMPs) los cuales constituyen una opción promisoriosa al presentar un amplio espectro de actividad frente a varios microorganismos patógenos empleándose como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas y / o complementar la terapia con los antibióticos convencionales pues tienen sinergismo con estos. Los péptidos antimicrobianos pueden actuar directamente sobre los microorganismos o indirectamente a través de la activación del sistema inmune innato [4].

En este sentido, estudios recientes *in vivo* indican que las Células Estromales Mesenquimales (CEM) poseen una función efectora antimicrobiana directa debido a la secreción de AMPs naturales, los cuales tienen un amplio espectro dirigido contra bacterias, parásitos, protozoarios y virus clínicamente relevantes [5]. Las CEM son células residentes del estroma tisular de diversos órganos y poseen un limitado, aunque importante potencial de regeneración tisular, especialmente de tejido óseo, cartilaginoso y vascular. De manera remarcable, las CEM poseen un potente efecto de regulación de la respuesta inmune y son capaces de recuperar y mantener la homeostasis de tejidos ante potenciales daños tisulares [6]. Las CEM originalmente se aislaron de la médula ósea, aunque también se han identificado en otros órganos y tejidos [7] dentro de los cuales se encuentra la gelatina de Wharton (GW) del cordón umbilical [8]. El uso de la GW como fuente de CEM ofrece importantes ventajas para su futura aplicación clínica debido a la facilidad de obtención, alta proliferación e hipoinmunogenicidad entre otras [9]. Sin embargo, a la fecha no se conoce el potencial antimicrobiano de las CEM-GW ni se sabe si este puede estar mediado por la secreción del AMPs. La evaluación de la expresión in vitro de los péptidos antimicrobianos expresados por las CEM-GW puede marcar el inicio de futuros estudios con enfoques terapéuticos que ayuden a disminuir de forma natural la población bacteriana.

Teniendo en cuenta el panorama anteriormente descrito sobre la problemática mundial en resistencia bacteriana y la necesidad de buscar mecanismos alternativos para la inhibición de microorganismos es importante plantear las siguientes preguntas de investigación: ¿Las CEM-GW poseen actividad antimicrobiana? ¿La actividad antimicrobiana está asociada a la secreción de péptidos antimicrobianos?

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton

1.2 Objetivos específicos

- Establecer el modelo experimental del cultivo bacteriano y el cocultivo con Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton
- Caracterizar el efecto de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton sobre el crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas
- Evaluar la expresión génica y proteica de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1 (hBD-1), Lipocalina-2 (LCN2) y Hepsidina (HAMP).

2. Marco teórico y estado del arte

2.1 Agentes Antimicrobianos y su mecanismo de acción

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas o físicas que destruyen o previenen el crecimiento de microorganismos. Este término incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética y para su desarrollo debe cumplir tres condiciones: La primera es poseer propiedades antimicrobianas; la segunda es que estas propiedades se desarrollen a bajas concentraciones y la tercera es que sea tolerado por el huésped [10].

Los agentes antimicrobianos presentan una gran variedad de mecanismos de acción que involucran la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, la síntesis proteica, la síntesis de ácidos nucleicos y la alteración de la membrana citoplásmica en el microorganismo blanco. Estos mecanismos pueden producir muerte bacteriana (agente bactericida) o impedir el desarrollo y reproducción del germen (agente bacteriostático) (Figura 1 tomada de [11]).

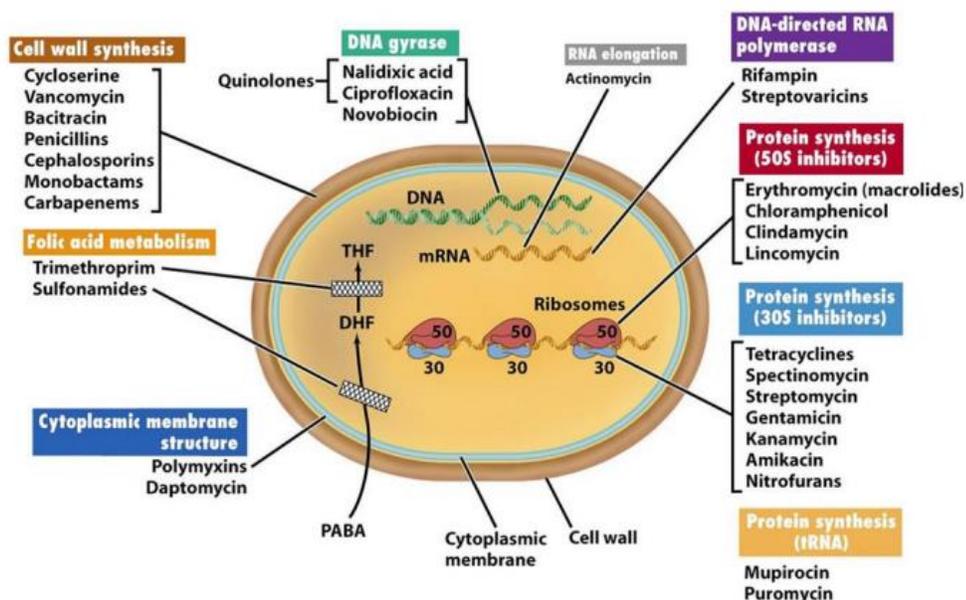


Figura 1: Mecanismos de acción de agentes antimicrobianos

En la Figura 1 se observan el mecanismo de acción de los de los principales grupos de antimicrobianos de interés. La inhibición de la síntesis de la pared celular se constituye en el mecanismo más importante y se desarrolla en 3 etapas sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: La etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano; el transporte a través de la membrana citoplásmica, y la organización final de la estructura del peptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared [12].

Otro mecanismo es la alteración funcional de la membrana celular, la cual tiene como función preservar distintas propiedades vitales, como la permeabilidad selectiva, el transporte activo y, por lo tanto, el control de la maquinaria molecular interna. Si la integridad funcional de la membrana se rompe, las macromoléculas y los iones escapan de la célula, y se produce daño celular o muerte [13].

Los antimicrobianos también pueden actuar en la inhibición de la estructura y función de los ácidos nucleicos bloqueando la replicación o deteniendo la transcripción bacteriana usando como dianas las enzimas que conforman estos procesos y finalmente afectando negativamente a la polimerasa de RNA que a su vez impide la síntesis de RNA [14]. En la inhibición de la síntesis de proteínas, la cual es catalizada por ribosomas y factores citoplasmáticos, los antimicrobianos se dirigen a la subunidad 30S o 50S del ribosoma evitando la formación de proteínas o formando una estructura errónea que pueden causar la lisis celular. Por último encontramos el bloqueo de vías metabólicas como el metabolismo de ácido fólico, ya que las bacterias dependen de este cofactor para su desarrollo y la interrupción de su síntesis afecta dramáticamente el crecimiento celular [15].

2.2 Péptidos antimicrobianos (AMPs)

2.2.1 Historia y características

Los péptidos antimicrobianos (AMPs en inglés) han sido reconocidos hace más de 90 años, como moléculas conservadas evolutivamente que se encuentran tanto en procariontas

como en eucariotas (Figura 2). La primera proteína antimicrobiana reportada fue la lisozima identificada en el año 1922 a partir de moco nasal por Alexander Fleming [16]. Posteriormente, en 1939 se aisló la gramicidina de una cepa de *Bacillus* del suelo y se demostró su efectividad para proteger frente a infecciones de neumococos [4]. Más tarde la gramicidina se comenzó a comercializar como antibiótico luego de que fuera usada con éxito para tratar las heridas infectadas y úlceras de la pial de los cobayos [17]. En 1941 se descubrió otro AMP, la tirocidina la cual era eficaz contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero, exhibió toxicidad para las células sanguíneas humanas. Ese mismo año se aisló la purotionina de una planta y se encontró que tenía actividad antimicrobiana contra hongos y algunas bacterias patógenas. El primer AMP de origen animal fue la defensina, péptido aislado de conejos en el año 1956. En los años siguientes se descubrió la bombinina de epitelios, la lactoferrina de la leche de vaca y se demostró que los leucocitos humanos contenían AMP en sus lisosomas [18, 19].

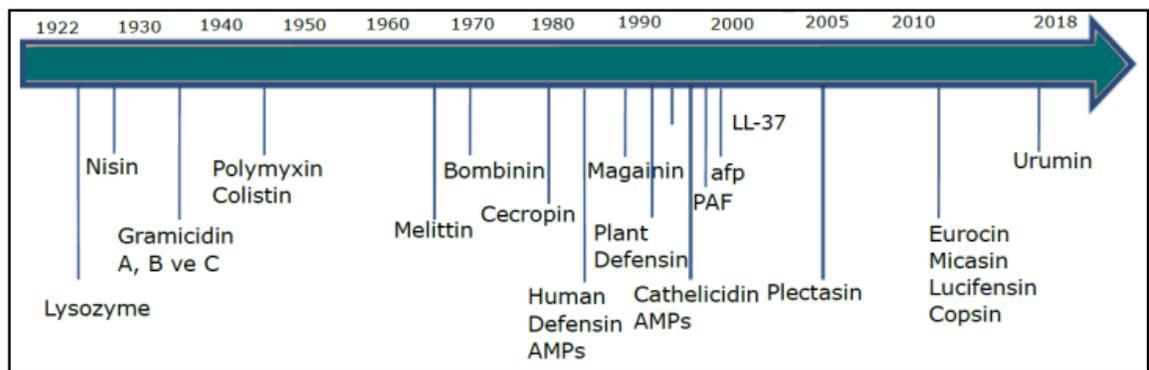


Figura 2: Cronología de descubrimiento de AMPs, tomado de [19].

El interés clínico y científico enfocado al entendimiento de los AMPs continuó, y para el año 1994 se descubrió en la piel de los mamíferos el AMP catelicidina, la cual demostró la relevancia de los antimicrobianos para la defensa del huésped. Desde entonces los AMPs se han caracterizado ampliamente en todos los organismos multicelulares, depositando más de 5.000 AMPs en la base de datos de péptidos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) para el año 2016 [16].

Los péptidos antimicrobianos son oligopéptidos con un número variable de aminoácidos que pueden diferir en tamaño, secuencia y estructura [20], se pueden encontrar tanto en

procariotas como en eucariotas y se cree que son la primera línea de la defensa inmune innata contra virus, bacterias y hongos. Por lo tanto, los AMPs desempeñan un papel importante en detener la mayoría de las infecciones antes de que causen síntomas, están presentes constitutivamente, mientras que otros pueden ser inducidos en respuesta a infecciones o afecciones inflamatorias [21].

2.2.2 Mecanismos de acción

A diferencia del mecanismo de acción de los antibióticos los cuales generalmente se dirigen a proteínas específicas, los péptidos antimicrobianos actúan mayoritariamente sobre las membranas bacterianas, creando una ventaja ya que la resistencia microbiana por mutación genética es menos probable [12].

La mayoría de los AMPs son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas lo que facilita su interacción e inserción en la paredes celulares aniónicas y membranas de fosfolípidos de los microorganismos. Se han propuesto varios mecanismos de acción que están relacionados con complejas interacciones moleculares [22], que se dirigen a la membrana de las células bacterianas y causan la desintegración de la estructura de la bicapa lipídica [23]. Otros investigadores han demostrado que algunos AMPs no interactúan directamente con la membrana bacteriana, sino que eliminan las bacterias al inhibir algunas vías importantes dentro de la célula, como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas (Figura 3)

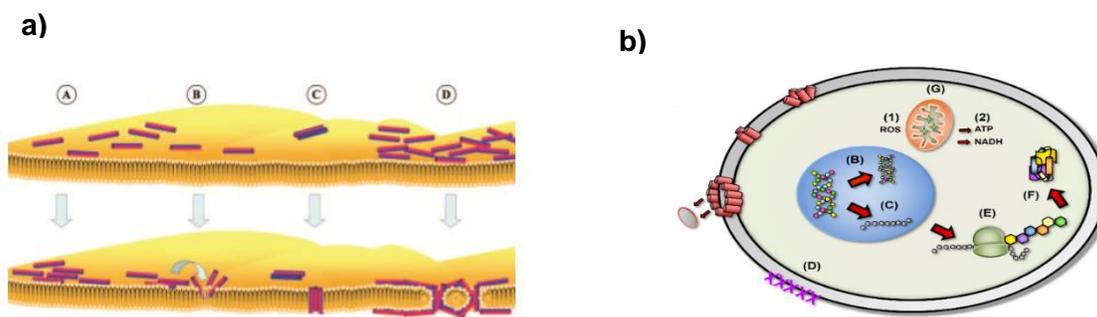


Figura 3: Mecanismos de acción de los AMPs, tomado y modificado de [24]

Como se observa en la figura 3a, una vez alcanzan un umbral de concentración los péptidos se insertan a través de la membrana bacteriana. Los péptidos se reorientan para

abarcar la membrana como un agregado con complejos lípidos en forma de micelas, pero no adoptan ninguna orientación particular y tampoco se insertan en la membrana, sino que permanecen asociados en la cara externa y al alcanzar un punto crítico formando una clase de alfombra que debilita la membrana causando su colapso por pérdida del citoplasma.

Seguidamente los péptidos se insertan perpendicularmente al plano de la bicapa creando un poro hidrofílico lo que genera una pérdida en el equilibrio osmótico en la membrana perpendicular al plano de la bicapa, formando bastones. Eventualmente, un importante acumulo de péptidos se arregla cubriendo las áreas locales y formando un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático, o desintegrándose espontáneamente, lo que lleva a la translocación de los péptidos hacia el citoplasma donde pueden afectar blancos de acción interna. [23, 25].

Alternativamente algunos péptidos antimicrobianos son capaces de traspasar la membrana bacteriana acumulándose internamente, uniéndose al ADN mediante motivos de unión relacionado con las histonas o dirigiéndose específicamente a algunas enzimas asociadas a este como la topoisomerasa I y la RNA polimerasa (Figura 3b). De este modo, estos péptidos pueden inhibir el crecimiento bacteriano mediante la interacción con los ácidos nucleicos o, en cuanto a la síntesis proteica, pueden interrumpir la incorporación de histidinas, alterando las enzimas o su plegamiento mediante la inhibición de chaperonas específicas [26].

Los AMPs pueden ser activos contra los patógenos que son resistentes a los antibióticos convencionales. Si bien estas características hacen que los AMPs sean buenos candidatos para el desarrollo de fármacos, su desarrollo clínico y comercial necesita superar desafíos, como la vía de administración, la toxicidad potencial, la estabilidad y el alto costo de producción de péptidos [16].

Dentro de los péptidos antimicrobianos más relevantes encontramos las defensinas, hepcidina y lipocalina descritas por varios autores y aislados de varios tejidos como lo podemos ver en la (Tabla 1) tomada de [16].

TABLE 1 | Human selected antimicrobial peptides.

Name	Source	Activity	3D structure* (35)			Length (aa)	Reference
			α	β	$\alpha\beta$		
Cathelicidin LL-37	Neutrophils, skin monocytes, lymphocytes, MCS, sweat, airway surface liquid, saliva	G, V, F, P, C	✓			37	(40)
Dermcidin	Skin, sweat	G, F	✓			47	(41)
Granulysin	Cytolytic T and NK cells	G, F, P, C	✓			74	(42)
Histatin 5	Saliva	V, F	✓			24	(43)
Lactoferricin	Human milk, tears, saliva, bronchial mucus, and seminal plasma	G, V, F, P	✓			49	(44)
Lysozyme	Saliva, tears, intestine	G, F	✓			130	(45)
Psoriasin/S100A7	Skin, salivary gland, breast	G-	✓			101	(46)
α -Defensin HNP-1	Neutrophils, bone marrow	G, V, F, P, C		✓		30	(47)
α -Defensin HNP-2	Neutrophils, bone marrow	G, V, F, C		✓		29	(47)
α -Defensin HNP-3	Neutrophils, bone marrow	G, V, F, C		✓		30	(47)
α -Defensin HNP-4	Neutrophils	G, V, F		✓		33	(48)
α -Defensin HD-5	Paneth cells, intestine, female reproductive system	G, V, F		✓		32	(49)
α -Defensin HD-6	Paneth cells, intestine	G, V, F		✓		32	(50)
Hepcidin 20	Plasma, urine, liver	G, F		✓		20	(51)
Hepcidin 25 (LEAP-1)	Plasma, urine/liver heart, kidney, adipose tissue, pancreas and hematopoietic cells, MSCs, myeloid cells (monocytes, macrophages, neutrophils)	G, F		✓		25	(51)
Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)	Tears, saliva, airway, gastrointestines, genital tracts	G, V, F		✓		102	(52)
RNase 5 angiogenin	Liver, skin, intestine	G+, F		✓		125	(53)
Chemokine CCL1	T cells	G		✓		73	(54)
Chemokine CCL8	Fibroblasts, endothelial cells	G-		✓		75	(54)
Chemokine CCL13	Epithelial cells, mononuclear cells	G-		✓		75	(54)
Chemokine CCL20	Skin, B cells, myeloid dendritic cell, memory T cell	G, F, P		✓		69	(54, 55)
Chemokine CCL27	Memory T cell	F		✓		56	(56)
Chemokine CXCL1	Macrophages, neutrophils, epithelial cells	G		✓		73	(54)
Chemokine CXCL10	Monocytes, endothelial cells, fibroblasts	G, F, P		✓		77	(57)
β -Defensin hBD-1	Kidney, skin, salivary glands	G, F, C		✓		36	(58)
β -Defensin hBD-2	Skin, lung, epithelia, uterus, salivary glands	G, V, F		✓		41	(58)
β -Defensin hBD-3	Skin, salivary glands	G, V, F		✓		45	(58)
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL, Lcn2)	Bone marrow, uterus, prostate, salivary gland, stomach, appendix, colon, trachea, lung, small intestine, pancreas, kidney and prostate. MSCs, neutrophils, macrophages, and dendritic cells	G		✓		178	(59-63)
RegIIIa	Intestine	G+		✓		149	(64)
RNase 7	Urinary tract, respiratory tract, skin	G, F		✓		128	(65)

*Data from the APD (http://aps.unmc.edu/AP/database/query_input.php). Antimicrobial activities are annotated as G, bacteria; G+, Gram-positive bacteria only; G-, Gram-negative bacteria only; F, fungi; P, parasites; V, viruses; C, cancer cells.

Tabla 1: Péptidos antimicrobianos aislados en humanos, tomada de [16].

2.2.3 Defensinas

La defensinas son péptidos catiónicos caracterizados por tener una estructura conservada de seis cisteínas los cuales están unidos entre sí por tres puentes de disulfuro los cuales podemos observar en la figura 4 con líneas amarillas, el número de aminoácidos que lo conforman pueden variar de 20 a 45, posee enlaces de disulfuro [24, 27]

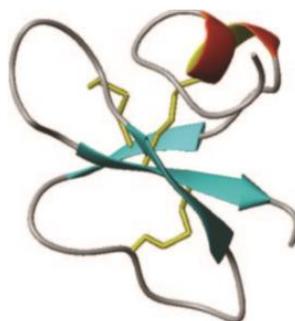


Figura 4: Estructura del AMPs defensina, tomado de [24]

Se clasifican en α -Defensinas, β -Defensinas o θ -Defensinas dependiendo de su origen celular, estructura génica y conectividad de los residuos de cisteína en su secuencia [28]. Estos AMPs juegan un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa contra las infecciones microbianas y virales. Para el caso de las β -defensinas, estas contienen seis residuos de cisteína conectados entre sí por puentes de disulfuro, tienen de 36 a 42 residuos de aminoácidos, se clasifican en b-defensina humana 1 (hBD-1), b-defensina humana 2 (hBD-2) y b-defensina humana 3 (hBD-3) y son péptidos principalmente funcionales en humanos expresados por células epiteliales, granulocitos y CEM. Dada su importante actividad antimicrobiana y antiviral, la modulación de la producción endógena de defensina mediante el uso de estímulos reguladores específicos hace que las defensinas sean candidatos prometedores para la terapia celular [29].

2.2.4 Hepcidina

El término de hepcidina fue sugerido por Park y Cols quienes descubrieron y aislaron esta proteína a partir de muestras de orina humana [30]. Es un péptido antimicrobiano que se caracterizan por ser rico en cisteínas en total 8 pareadas mediante enlaces disulfuro. De ellos, uno se establece entre residuos de cisteína adyacentes, lo que constituye otra característica distintiva de la hepcidina [31]. En el modelo estructural de la hepcidina (Figura 5) se pueden evidenciar los extremos amino- y carboxi-terminales se representan como N y C, respectivamente. El patrón de puentes disulfuro se representa en la secuencia de color amarillo.

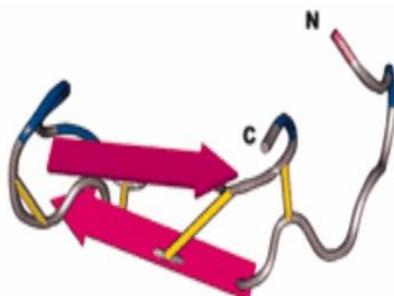


Figura 5: Modelo estructural de la hepcidina, tomado de [31]

La hepcidina es un péptido natural de defensa que se produce principalmente por hepatocitos, pero también por otras células, incluyendo CEM y leucocitos mieloides [32], la hepcidina actúa como una hormona reguladora de hierro, así como también ejerce un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra especies fúngicas y bacterias relevantes clínicas tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus del grupo B* [33].

2.2.5 Lipocalina

El nombre lipocalina fue propuesto en 1987 por Pervai y Brew, son un grupo de proteínas de una masa molecular promedio de 18- 20 kDa y basado en estudios previos, la estructura tridimensional sugieren una estructura aceptora de ligandos, dependiente de secuencias aminoacídicas muy conservadas que exhiben formación de ocho láminas plegadas beta con las que conforman una estructura similar a una canasta (Figura 6) [34].

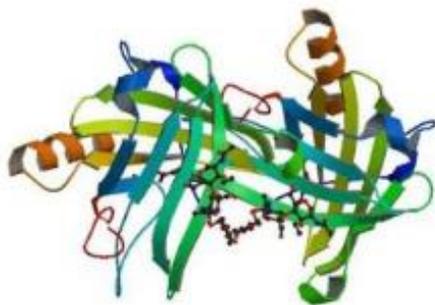


Figura 6: Modelo estructural de la lipocalina, tomado de [34].

Son una familia de pequeñas proteínas solubles que funcionan como transportadores que unen pequeñas moléculas orgánicas. Se asocian con muchos procesos biológicos tales como la respuesta inmune, el crecimiento celular, el metabolismo, la síntesis de prostaglandinas y el transporte de hierro [35].

La lipocalina (LCN2) parece tener un papel relevante en el mecanismo innato de defensa antimicrobiana ejerciendo una función directa contra los patógenos [36]. Es importante resaltar que la LCN2 se encuentra como componente de los gránulos de neutrófilos, macrófagos, adipocitos, CEM y células epiteliales en respuesta a condiciones inflamatorias [37]. El mecanismo antimicrobiano de este péptido viene dado por su capacidad para secuestrar los quelantes de hierro bacterianos, llamados sideróforos, que en consecuencia impiden la transferencia de hierro a las bacterias y detienen su crecimiento [38].

2.2.6 Potenciales aplicaciones clínicas de los AMPs

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han sido definidos como armas antiguas que evolucionaron contra infecciones microbianas. Originados por todos los organismos, desde procariotas a humanos, juegan un papel fundamental en la inmunidad innata proporcionando una defensa contra las infecciones [39]. Debido a sus propiedades antimicrobianas naturales y baja tendencia a desarrollar resistencia bacteriana los AMPs representan en la actualidad una alternativa para el diseño de agentes antimicrobianos. Una de las principales características de los AMPs es que actúan destruyendo y/o desestabilizando las membranas celulares, además pueden llegar a afectar blancos intracelulares a diferencia de los antibióticos convencionales [40]. Por sus diversas actividades, como su papel en la inmunidad del hospedero, su alta ubicuidad y su particular mecanismo de acción, se sugiere la posibilidad de usarlos no solamente como agentes antimicrobianos sino como inmunomoduladores en enfermedades infecciosas y no infecciosas [41]. A lo anterior, se adiciona el esfuerzo considerable que se ha hecho para determinar su mecanismo de acción, comprender las bases estructurales de la selectividad celular y descubrir nuevos péptidos optimizados a partir de estrategias de mejoramiento para aplicaciones específicas [4].

2.3 Células Estromales Mesenquimales (CEM)

2.3.1 Generalidades

La idea de que una población de células madre mesenquimales no hematopoyéticas existían en médula ósea se remonta al siglo XIX a través del trabajo del patólogo alemán Cohnheim, quien hipotetizó que las células fibroblásticas que participaban en la reparación de lesiones provenían de la médula ósea. Más tarde, a principios del siglo XX, el científico ruso Alexander Maximov propuso que células sanguíneas comprometidas en las reparaciones de lesiones descendían de un tallo hematopoyético celular a través de señales de células estromales de médula ósea [42].

A finales de la década de los 60 con los trabajos realizados por Friedenstein en su grupo de investigación, utilizando ratones y cobayos describieron por primera vez una población de células adherentes provenientes de médula ósea las cuales daban origen al microambiente hematopoyético. A estas células se les denominó mecanocitos estromales. Posteriormente, en la década de los 80, varios grupos de investigación iniciaron a caracterizar la población celular de la médula ósea capaz de dar origen al estroma medular, hueso y cartílago.

Durante esta etapa no solamente trabajaron en la caracterización de las células sino también en su biología, basados especialmente en estudios en modelos animales donde se demostró que las células de médula ósea contenían progenitores fibroblastos y tenían la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo y que a partir de una pequeña cantidad de células de médula que se inoculaban en cámaras se generaba una gran cantidad de células estromales, lo que dejaba claro su potencial de proliferación y diferenciación (Figura 7) [43].

Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

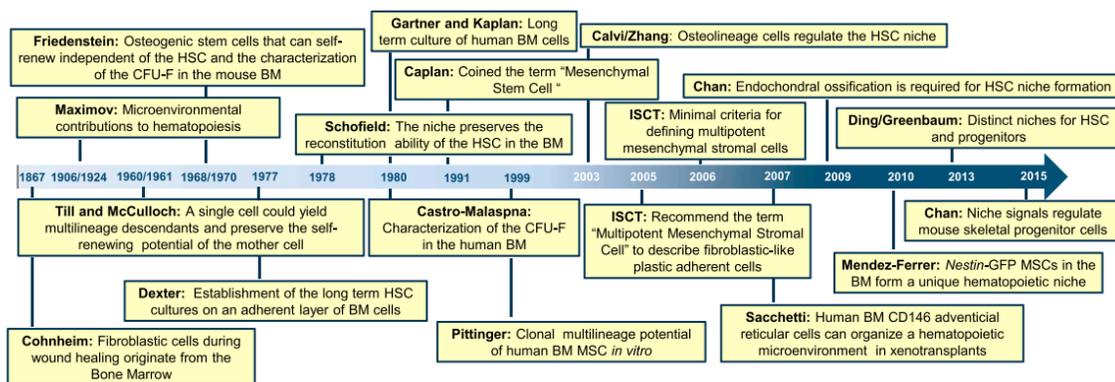


Figura 7: Representación cronológica de los descubrimientos que se han realizado con las CEM

En la figura 7 se observa una línea del tiempo donde se describe el trabajo de científicos de los siglos XIX y XX. Es así como Cohnheim y Maximov dieron forma a la hipótesis inicial sobre la existencia de un tallo de células de médula ósea. Este concepto fue posteriormente refinado por Schofield quien planteó la hipótesis de que el microambiente en el que residen las CEM regula y preserva su actividad. La existencia de MSC se demostró a través del trabajo de Friedenstein, que fue crucial en el desarrollo de protocolos de cultivo de CEM a largo plazo. Ya en el siglo XXI se demostró la existencia de un microambiente hematopoyético, a partir de los trabajos de Calvi y Zhang. Desde entonces, los avances tecnológicos basados en modelos animales genéticamente modificados y la clasificación de las células ha progresado de manera significativa [43].

Mucho del conocimiento actual sobre las propiedades biológicas y terapéuticas de las CEM ha sido generado a partir de estudios realizados en la médula ósea. Sin embargo, el uso de otras fuentes alternativas de tejidos tales como tejido adiposo, placenta, piel, pulpa dental, sangre de cordón umbilical, fluido amniótico, células perivasculares de cordón umbilical, gelatina de Wharton, tejido sinovial, leche materna y sangre menstrual [7], ha empezado a ganar interés dado la facilidad de colección de algunos de estos tejidos, evitando el uso de técnicas invasivas como lo es el procedimiento de aspiración de la médula ósea durante su aislamiento.

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular, la caracterización de las CEM se basa generalmente en tres criterios: adhesión al plástico, expresión de antígeno de superficie CD105, CD73 y CD90, no expresar los antígenos hematopoyéticos CD34, CD45, CD14 ni

moléculas de superficie HLA-DR y potencial de diferenciación en osteoblastos, adipocitos y condroblastos[44]. Desde su descubrimiento las CEM se han caracterizado intensamente y dada su facilidad de obtención, expansión y escalamiento clínico son utilizadas como agentes terapéuticos para diversas patologías de carácter inflamatorio, autoinmune o degenerativo, en particular en afecciones osteo-articulares [45].

A pesar de su homogeneidad en términos de identidad y potencia, las CEM de diferentes orígenes comparten características biológicas, pero difieren en otros aspectos como por ejemplo el inmunofenotipo. Por ejemplo, las CEM obtenidas a partir de tejido adiposo son positivas en pases tempranos para CD34, mientras CEM de otras fuentes no expresan este marcador [20]. Kern y colaboradores compararon CEM aisladas de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical encontrando que las CEM obtenidas de médula ósea tienen la capacidad de proliferación más baja, en términos de tasa de proliferación y número de doblajes poblacionales, mientras que las CEM de cordón umbilical muestran la tasa más alta de proliferación. Similarmente, el potencial de diferenciación de las CEM también ha registrado diferencias respecto al origen de las células, teniendo entonces que las CEM aisladas de pulpa dental se diferencian preferiblemente en dentina en lugar de hueso en ensayos in vivo [46]. Las CEM de medula ósea presentan una tendencia marcada a diferenciarse en condrocitos y osteocitos en comparación con las CEM de tejido adiposo, que son más eficientes en estimular la angiogénesis. Finalmente, respecto a los análisis de expresión genética, las CEM muestran una alta expresión de genes asociados con diferenciación osteogénica para CEM de médula ósea, mientras que CEM de cordón umbilical muestran una alta expresión de genes involucrados en angiogénesis [47].

Se ha demostrado que CEM aisladas de tejido adiposo tienen un mayor potencial angiogénico que las CEM de medula ósea [47]. En ensayos de inmunomodulación in vitro, se ha demostrado que a pesar que las CEM de medula ósea y tejido adiposo tienen efectos inmunomodulatorios similares al suprimir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica e inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas, las CEM de tejido adiposo tienen un efecto inmunomodulador más potente en relación dosis-respuesta en comparación con las de medula ósea. Esto puede ser explicado por su alta actividad metabólica, resultando en una alta producción de citoquinas involucradas en los mecanismos inmunosupresivos y anti-inflamatorios. Las CEM de tejido adiposo son

genética y morfológicamente más estables en cultivo por largo tiempo, muestran baja tasa de senescencia y alta capacidad proliferativa, además de mantener el potencial de diferenciación comparado con CEM de medula ósea [48]. Recientemente se ha demostrado que las CEM no solamente tienen propiedades inmunomoduladoras sino que ejercen fuertes efectos antimicrobianos a través de mecanismos directos e indirectos, directamente por moléculas efectoras responsables de la muerte bacteriana como los péptidos antimicrobianos (AMPs) [20]. Durante los últimos 10 años, la literatura sobre las propiedades de las CEM provenientes de tejidos como Médula ósea, pulpa dental, fluido menstrual y tejido adiposo ha aumentado dramáticamente en termino de publicaciones (Figura 8).

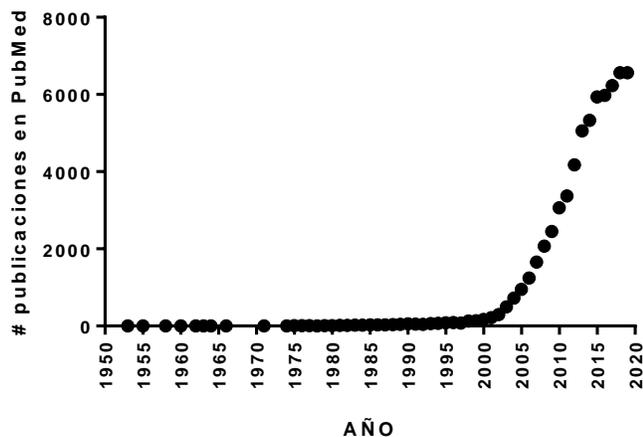


Figura 8: Publicaciones sobre CEM en PubMed

En la Figura 8 se observa el incremento en la investigación biomédica en el campo de las CEM, a partir del crecimiento en el número de publicaciones desde el año 1950 hasta el año 2019. Es importante indicar que a partir de comienzos de la década del 2000 se observó un crecimiento exponencial de las investigaciones en este tipo de células, debido al interés en su uso clínico y el potencial de aplicación en un sin número de condiciones clínicas [49].

2.3.2 Péptidos antimicrobianos y Células Estromales Mesenquimales (CEM)

Es ampliamente reconocido que las CEM poseen la capacidad de captar señales de peligro y daño celular y tisular e inmediatamente activar mecanismos compensatorios de reparación y regeneración. Uno de estos mecanismos está asociado a la expresión de receptores tipo Toll (TLR), específicamente TLR-2 y TLR-4, que participan en el reconocimiento de estructuras moleculares asociadas a los patógenos AMPs. Una vez la CEM reconoce un microorganismo en el medio vía sus receptores TLR-2/4, envía la señalización dentro de la célula para que inicie el proceso de síntesis de AMPs específicos para cada microorganismo circulante. En la figura 9 se describe gráficamente interactúan las CEM para crear la señalización específica y secretar AMPs [50].

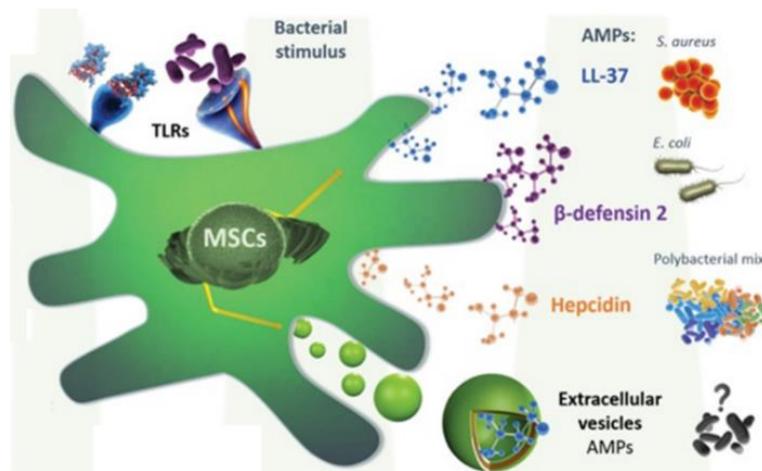


Figura 9: Representación esquemática donde se observa cómo las CEM aisladas de médula ósea secretan diferentes AMPs, tomado y modificado de [50].

Actualmente se conoce que las CEM aisladas de médula ósea expresan constitutivamente cuatro AMPs: catelicidina LL-37, β-defensina-2 humana (hBD-2), hepcidina y lipocalina-2 (Lcn2). La mayoría de los datos sobre las propiedades antimicrobianas de las CEM se han obtenido a partir de estudios in vitro, donde la eficacia antimicrobiana de las CEM aisladas de médula ósea, fluido menstrual, tejido adiposo y sangre de cordón umbilical es mediada por AMPs [50]. Estos AMPs han sido detectados tanto en cultivos no estimulados como

estimulados demostrando la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*[51]. Las CEM de diferentes orígenes o fuentes tienen la capacidad de reducir la carga de patógenos en diferentes modelos preclínicos, como se demuestra en el estudio realizado por Shin Soyung y colaboradores [52], donde se inoculó una endotoxina proveniente de *Escherichia coli* 0127 en ratas macho Sprague-Dawley, 30 minutos después de la introducción la endotoxina se inoculó por vía intravenosa (2×10^6 , 100 μ l) CEM provenientes de tejido adiposo humano. En los ratones que recibieron el tratamiento con las CEM se observó una disminución en el nivel de citocinas inflamatorias tanto en suero como en el pulmón y evitaron la apoptosis en el riñón, con los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el tratamiento utilizado a partir de CEM regula la respuesta inflamatoria por lo tanto, las CEM humanas pueden ser beneficiosas en infecciones bacterianas debido a sus propiedades antimicrobianas [51].

Teniendo en cuenta el notable éxito en la utilización de CEM en el tratamiento de diversas infecciones en modelos animales y los pocos ensayos clínicos publicados en humanos con infecciones bacterianas, es razonable predecir un éxito similar en el uso de la terapia con CEM en humanos en un futuro cercano [53].

2.3.3 Células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW)

El cordón umbilical humano comienza a desarrollarse alrededor de la quinta semana de gestación y al término tiene una longitud promedio de aproximadamente 50 cm[54], está compuesto por dos arterias y una vena que lo irrigan de sangre enriquecida de células madre hematopoyéticas, las cuales están incrustadas en un tejido conectivo mucoso conocido como gelatina de Wharton (Figura 10) [55].

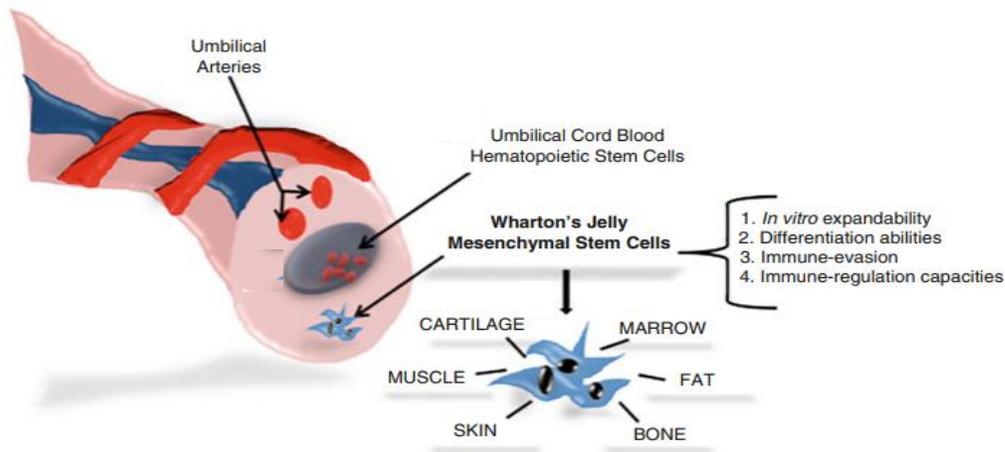


Figura 10: Esquema de la estructura anatómica de cordón umbilical y las (CEM-GW), tomado de [55].

A partir del cordón umbilical es posible aislar CEM-GW. Este tipo de célula mesenquimal muestra múltiples características como alta proliferación, inmunosupresión y pueden mostrar actividad potencial terapéutico, como las CEM aisladas de médula ósea o tejido adiposo[56]. Esta fuente alternativa de CEM se hizo factible tras los trabajos de McElreavey, quien cultivo de células de GW, descrito por primera vez por Thomas Wharton en 1656. Tras la última década, los esfuerzos de investigación han intentado optimizar el aislamiento y la diferenciación de estas células derivadas de GW [57].

Las CEM-GW han sido descritas particularmente por poseer un alto potencial inmunomodulador, caracterizado por la producción en grandes cantidades de interleucina 10, TGF- β y expresan HLA-G el cual desempeña un papel en la tolerancia inmune durante el embarazo al evadir una respuesta inmune materna contra el feto e inducir la expansión de las células T reguladoras, lo que contribuiría a la supresión de las respuestas efectoras a los aloantígenos. Las CEM-GW poseen propiedades inmunomoduladoras que incluyen la regulación positiva de ligandos coestimuladores negativos, la secreción de factores inmunosupresores solubles, la generación de células de memoria, la fusión celular para escapar del reconocimiento, los mecanismos de evitación inmunológica específicos de la interfaz fetal-materna, la atenuación de las funciones de las células presentadoras de antígeno, la migración alterada de las células inmunes y la tolerancia a la apoptosis por anergia de las células T [57]. Adicionalmente las CEM-GW son menos inmunogénicas lo que las hace más susceptibles para el trasplante alogénico y xenogénico

Recientemente se han realizado múltiples investigaciones intentando optimizar su aislamiento y diferenciación administrándolas mediante procedimientos mínimamente invasivos como infusión intravenosa e inyecciones directas en el sitio lesionado sin complicaciones. Así mismo su uso en la clínica se ha probado a partir de abordajes de terapia celular para el tratamiento de enfermedades como la enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso sistémico [58], trastornos cardiovasculares, regeneración de cartílago y reparación del nervio periférico. Sin embargo, aún falta indagar más sobre su potencial terapéutico ya que persiste el desconocimiento de muchas de sus propiedades biológicas y otras potenciales aplicaciones que puedan llegar a presentar estas células. En particular, el uso de CEM de GW como fuente de producción de péptidos antimicrobianos que permitan abrir su horizonte de aplicación biomédica en el control del crecimiento bacteriano, disminuyendo así el riesgo de infección, está todavía por ser explorada en profundidad [59]

3. Materiales y métodos

3.1 Estandarización de curvas de crecimiento cepas ATCC

Las cepas seleccionadas para los ensayos fueron: ATCC *Escherichia coli* 25922, ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 de la casa comercial Thermo Scientific, estas cepas se encuentran descritas en el informe de la OMS publicado en el año 2018 por ser causantes enfermedades graves [2]. Las cepas se reconstituyeron según los protocolos de la casa comercial y preservaron en viales con crioperlas a -20°C . La cepa ATCC a evaluar se activó colocando una crioperla (Ref. TS72MX25), en 9 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) (Ref. 42081 de la casa comercial Biomerieux), se incubó a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 5% de CO_2 por un periodo de 24h, pasado este tiempo se inoculó 5 mL de la muestra en un frasco de cultivo BACT/ALERT® BPA (Ref. 279018 de la casa comercial Biomerieux) con 40 mL de caldo BHI para un volumen final de 45 mL, el experimento se realizó por duplicado, posteriormente se introdujeron los frascos en el equipo BACT/ALERT® 3D con el fin de determinar la fase exponencial evaluando la curva de crecimiento (Figura 11).

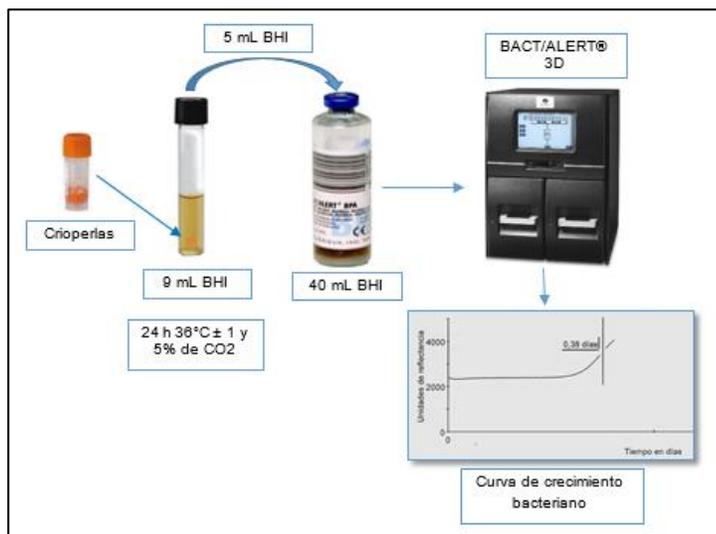


Figura 11: Esquema Estandarización curvas de crecimiento cepas ATCC (1)

3.2 Estandarización del inóculo de cepas ATCC

Cómo los tiempos de generación en las bacterias varían ampliamente dependiendo de los microorganismos fue de vital importancia establecer la fase de crecimiento media exponencial de cada una de las cepas ATCC utilizadas en los ensayos. Para realizar el cálculo se utilizó la siguiente formula [60]:

$$FME = t_f - t_i$$

En donde:

FME = Fase media exponencial

t_f = Tiempo final fase exponencial

t_i = Tiempo inicial fase exponencial

En experimentos previos está documentado que al realizar pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano haciendo uso de sustancias antimicrobianas es recomendable que las bacterias con las cuales se realicen los ensayos se encuentren en fase exponencial, debido a que toda su maquinaria se halla activa realizando procesos de replicación, transcripción, traducción y síntesis de la pared celular encontrándose aumentada la tolerancia a los antimicrobianos [61, 62].

3.3 ATCC *Escherichia coli* 25922

La *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo presente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente, y aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas sin embargo algunas de ellas pueden causar graves enfermedades [1].

Para estandarizar el inóculo de la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 se tomó una crioperla (Ref. TS72MX25), se introdujo en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) (Ref. 42081 de la casa comercial Biomerieux), el tubo se colocó a incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 5% de CO_2 por un periodo de 24h (Figura 11). Pasado este tiempo se tomó 1 mL del

cultivo y se sembró en 9 mL de caldo BHI por dos horas de incubación. La suspensión se adiciono en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 4200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 10 mL de solución salina al 0.9%. De la suspensión anterior se tomó 1 mL, se dispense en un tubo plástico transparente y se midió la densidad óptica con un DensiCHEK™ Plus, se agregaron 60 gotas de solución salina al 0.9% hasta llegar a una lectura de 2.0 McFarland. Posteriormente de este inculo se tomó 1 mL y se suspendió en 9 mL de PBS 1X, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-6} y esta dilución se sembró por triplicado en 1 mL en agar LB (Luria Bertani) por profundidad para posterior recuento de UFC (Figura 12).

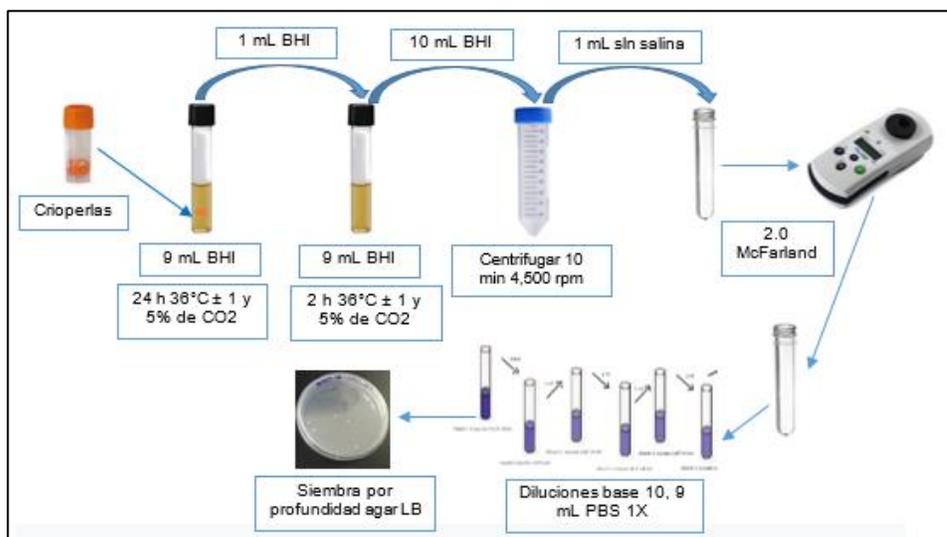


Figura 12: Esquema Estandarización curvas de crecimiento cepas ATCC (2)

3.4 ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

La *Klebsiella pneumoniae* es un bacilo gram negativo no móvil, es una bacteria ubicua en la naturaleza, de tal forma que se encuentra en las superficies de las aguas, tierra y plantas, en el humano se encuentra específicamente en la mucosa de nasofaringe y del intestino, alcanzando cifras de detección entre el 5 y el 38% en heces, y entre 1 al 6% en nasofaringe, es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. Usualmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, y de acuerdo con sus determinantes antigénicos se puede clasificar en 77

serotipos diferentes [61]. Para estandarizar el inóculo de la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 se tomó una crioperla (Ref. TS72MX25), se introdujo en 9 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) (Ref. 42081 de la casa comercial Biomerieux) (Figura 11). Brevemente, el tubo se colocó a incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 5% de CO_2 por un periodo de 24h y pasado este tiempo se tomó 1 mL del cultivo y se sembró en 9 mL de caldo BHI. Pasadas dos horas de incubación la suspensión se adiciono en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 4200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 10 mL de solución salina al 0.9%.

De la suspensión anterior se tomó 1 mL, se dispuso en un tubo plástico transparente y se midió la densidad óptica con un DensiCHEK™ Plus y se agregaron 60 gotas de solución salina al 0.9% hasta llegar a una lectura de 2.0 McFarland. De nuevo, de este inóculo se tomó 1 mL y se suspendió en 9 mL de PBS 1X, para realizar diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-6} . Esta dilución se sembró por triplicado 1 mL en agar LB por profundidad para posterior recuento de UFC (Figura 10).

3.5 ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras, se caracteriza porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva, es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es, gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbilidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario [63].

Para estandarizar el inóculo de la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 se tomó una crioperla (Ref. TS72MX25), se introdujo en 9 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) (Ref. 42081 de la casa comercial Biomerieux) y el tubo se incubó a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 5% de CO_2 por un periodo de 24h (Figura 11). Pasado este tiempo se tomó 1 mL del cultivo y se sembró en 9 mL de caldo BHI en incubó por dos horas adicionales. La suspensión se adicionó en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 4200 rpm por 10 minutos,

se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 10 mL de solución salina al 0.9%.

De la suspensión anterior se tomó 1 mL, se dispuso en un tubo plástico transparente y se midió la densidad óptica con un DensiCHEK™ Plus, se agregaron 50 gotas de solución salina al 0.9% hasta llegar a una lectura de 2.0 McFarland. De este inóculo se tomó 1 mL y se suspendió en 9 mL de PBS 1X, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-5} , esta dilución se sembró por triplicado 1 mL en agar LB por profundidad para posterior recuento de UFC (Figura 10).

3.6 ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

El *Staphylococcus epidermidis* es un coco Gram positivo que microscópicamente se observa como racimos de uvas; esta bacteria no produce la enzima coagulasa, generalmente es una bacteria inocua, ya que forma parte del microbiota de la piel y mucosas de los mamíferos, pero bajo ciertas circunstancias, algunas cepas pueden actuar como patógenos oportunistas. Hasta el momento, el principal factor de virulencia que se le conoce a esta bacteria es la capacidad de formar biopelícula en distintas superficies y materiales, es un patógeno oportunista importante, principalmente en pacientes que presentan inmunocompromiso o aquéllos a quienes se les han implantado dispositivos médicos como catéteres intravasculares, válvulas cardíacas o prótesis articulares [64].

Para estandarizar el inóculo de la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 se tomó una crioperla (Ref. TS72MX25), se introdujo en 9 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) (Ref. 42081 de la casa comercial Biomerieux) y el tubo se colocó a incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 5% de CO_2 por un periodo de 24h (Figura 11). Pasado este tiempo se tomó 1 mL del cultivo y se sembró en 9 mL de caldo BHI. Luego de dos horas de incubación, la suspensión se adiciono en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 4200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 5 mL de solución salina al 0.9%. La suspensión anterior (1 mL), se dispuso en un tubo plástico transparente y se midió la densidad óptica con un DensiCHEK™ Plus, se agregaron 40 gotas de solución salina al 0.9% hasta llegar a una lectura de 2.0 McFarland, de este inóculo se tomó 1 mL y se suspendió en 9 mL de PBS 1X, se realizaron diluciones seriadas

en base 10 hasta 10^{-5} de esta dilución se tomaron 3 mL y se inocularon en 7 mL de PBS 1X, finalmente esta última dilución se sembró por triplicado 1 mL en agar LB por profundidad para posterior recuento de UFC.

3.7 Estandarización de cultivos e inóculo de CEM-GW

3.7.1 Aislamiento de CEM-GW

Se evaluaron 3 donantes de CEM-GW extraídas a partir de cordones umbilicales obtenidos por donación altruista y procesados por personal de la Unidad de Terapias Avanzadas del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS). Para el procesamiento del cordón umbilical, éste se colocó en una caja de petri y se fragmentó utilizando un escálpelo, realizando cortes transversales por cada 3 cm de longitud; los fragmentos se almacenaron en un tubo falcón de 50mL provisto de buffer fosfato salino (PBS) 1X + Penicilina-Estreptomicina, se realizaron tres lavados sucesivos con agitación continua, a fin de remover la mayor cantidad de sangre posible. Una vez lavados los fragmentos, éstos se colocaron nuevamente en la caja de petri empleada anteriormente, se realizó un corte longitudinal a cada fragmento con el propósito de exponer la gelatina de Wharton, luego se removieron los capilares y se extrajo la gelatina de Wharton con ayuda de un bisturí estéril, raspando la región interna de la membrana que recubre el cordón umbilical. En este procedimiento se adicionó varias gotas de PBS-1X para humedecer el tejido. A continuación, se realizó la disgregación de la gelatina de Wharton con ayuda de una jeringa estéril adicionando en cajas de Petri, 2mL de la suspensión y 3mL de medio de cultivo suplementado (medio DMEM + 10% LPh + 1% Antibiótico/Antimicótico + 160 μ L de Heparina (16 Unidades)). Así mismo, se colocaron los explantes de la gelatina en las cajas de cultivo, las cuales se incubaron bajo condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂ y 20% de O₂). Se observó la positividad de los cultivos tres días después de este proceso. El medio de cultivo fue renovado cada tercer día, cambiándose la totalidad de volumen de medio por medio fresco, hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80%. Una vez el cultivo celular alcanzó esta confluencia, se efectuó el primer subcultivo o pase celular, que incluyó lavados con PBS 1X, seguido por adición de tripsina al 0,25% e incubación por varios minutos, se inactivó la tripsina con medio suplementado, todo el contenido se depositó en un tubo de 15 mL y se centrifugó a

1200 rpm por 6 minutos, por último se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio suplementado y se realizó recuento celular con azul de tripán para posterior siembra en frascos de cultivo T-75 (Falcon)

3.7.2 Caracterización inmunofenotípica de CEM-GW

Una vez realizado el aislamiento de las CEM-GW se procedió a caracterizarlas inmunofenotípicamente, para esto las CEM-GW se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en un volumen que permitiera dosificar aproximadamente 2×10^5 células por tubo, para la detección de los anticuerpos. Las muestras fueron incubadas por 20 minutos con Anti-CD73 (Ref.344010), Anti-CD90 (Ref.328114), Anti-CD105 (Ref. 323206), Anti-CD31 (Ref.303106), Anti-CD45 (Ref.304014), Anti-HLA-DR (Ref.307624), Anti-HLA-ABC (Ref. 311404), posteriormente, se realizó un lavado con PBS 1X y la lectura en el citómetro de flujo (BD FACSCanto™ II)

3.7.3 Estandarización del inóculo de CEM-GW

Las CEM-GW se descongelaron y se sembraron por duplicado aproximadamente 1×10^5 CEM-GW por pozo de 9 cm^2 (Placa de 6 pozos) hasta llegar a una confluencia de aproximadamente 70-80%. Un duplicado se envió para análisis microbiológico y al otro duplicado se adiciono tripsina al 0.25%, el contenido celular se depositó en un tubo de 15 mL, se centrifugo a 1200 rpm por 6 minutos pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de DMEM, se realizó recuento celular con azul de tripano en cámara de Neubauer, se contaron 4.6×10^3 CEM-GW x cm^2 aproximadamente y se sembraron en un frasco de cultivo T-75. Esta técnica se utilizó para expandir las células y congelar (-170°C) varios viales hasta pase 3. Estas células se emplearon posteriormente para cada uno de los ensayos.

Para llevar a cabo la inoculación bacteriana, se tomó un vial previamente congelado (-170°C) y se le agrego medio DMEM, el contenido se pasó a un tubo de 15 mL, se centrifugo a 1200 rpm por 6 minutos y pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de DMEM. Se realizó recuento celular con azul de tripano en cámara de Neubauer, se sembraron 1×10^5 CEM-GW por pozo en una caja de cultivo

de 9 cm² (Placa de 6 pozos) por triplicado en 1,5 mL de medio de expansión (DMEM + 10% LPh + 160 µL de Heparina) y las cajas se incubaron a 37°C, 5% CO₂ hasta que las células alcanzaron una confluencia del 60-70%.

Para el subcultivo una vez se alcanzó la confluencia del 60-70% se agregó tripsina al 0.25% el contenido celular se pasó a un tubo de 15 mL, se centrifugo a 1200 rpm por 6 minutos y pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de DMEM. Se realizó de nuevo recuento celular con azul de tripano en cámara de Neubauer y se sembraron 5 x10⁴ CEM-GW por pozo en cuatro placas de 12 pozos las cuales tenían 600 µL de DMEM + 10% LPh + 160 µL de Heparina, las cajas se incubaron a 37°C, 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 50-60%.

Al iniciar a cada uno de los ensayos a un pozo de cada una de las cuatro cajas se le agrego tripsina al 0.25%, el contenido celular se depositó en un tubo de 15 mL, se centrifugo a 1200 rpm por 6 minutos pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 500 µL de DMEM, se realizó recuento celular con azul de tripano en cámara de Neubauer. Para realizar los ensayos se debían obtener más de 1.5 x 10⁵ CEM-GW por pozo.

3.7.4 Estandarización del cocultivo de CEM-GW con las cepas bacterianas: ATCC *Escherichia coli* 25922, ATCC, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228.

Una vez estandarizado el inóculo bacteriano y el número de CEM-GW por pozo se caracterizó el efecto de las CEM-GW sobre el crecimiento de las cepas bacterianas ATCC *Escherichia coli* 25922, ATCC, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228, se tomaron dos cajas de cultivo de 12 pozos con 1.5 x 10⁵ CEM-GW y medio de expansión (DMEM + 10% LPh + 160 µL de Heparina) con una confluencia del 50-60%. Por cada cepa bacteriana, se removió el medio de cultivo y se lavó la monocapa de células dos veces con PBS 1X. Para acondicionar las células media hora antes de iniciar los ensayos se adiciono 800 µL de medio DMEM (control negativo) a una caja de cultivo en cada uno de los pozos y a la otra caja se le agrego 800

μL a cada uno de los 12 pozos de DMEM + 1% LPh + 160 μL de Heparina y se dejaron durante treinta minutos a 37°C, 5% CO₂. Pasado el tiempo de incubación las cajas de cultivo se inocularon con 20 a 50 UFC/mL de ATCC *Escherichia coli* 25922, ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 en fase exponencial. Se tomó registro fotográfico a las 0, 6 y 24 horas del cocultivo y se incubaron las cajas de cultivo a 37°C, 5% CO₂ por un periodo de 24 h en agitación continua.

Durante el periodo de incubación se tomaron 100 μL del sobrenadante conteniendo las bacterias a las 0, 6 y 24 horas. Los sobrenadantes recogidos se sembraron por duplicado con la técnica de profundidad en medio LB y se incubaron a 36°C ± 1 y 5% de CO₂ por 24h. Pasado el tiempo de incubación se realizó el conteo de UFC de cada una de las placas. Como control negativo se utilizó medio con CEM-GW sin inoculación bacteriana

3.8 Síntesis de primers para análisis de expresión de AMPs

Con el fin de analizar la expresión celular de AMPs a partir de la expresión del ARN mensajero, se realizó inicialmente una búsqueda bibliográfica de la secuencia específica de cada uno de los primers que se utilizarían en los ensayos [51, 65]. Para el control de calidad de las secuencias, se compararon las secuencias diseñadas con las encontradas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y de esta forma confirmar su especificidad. Finalmente, las secuencias confirmadas se enviaron a sintetizar en la firma Macrogen. A continuación, se presenta el conjunto de primers que abarcaron una región exónica de cada gen codificante para AMPs (Tabla 2).

Producto genético	Abreviatura	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
β-defensina-1	hBD-1	TAAGGTGGAAGGCTTGATGTCC	GGAGCCCTTTCTGAATCCGC
Lipocalina-2	LCN2	CTACGGGAGAACCAAGGAGC	GGTCGATTGGGACAGGGAAG
Hepcidina	HAMP	CCCATGTTCCAGAGGCGAAG	CTTGCAGCACATCCCACACT
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGTCTACATGGCAACTG

Tabla 2: Primers utilizados para PCR

3.9 Extracción y cuantificación del RNA de CEM –GW

Para el análisis de expresión de los diferentes genes que codifican para AMPs en CEM-GW inoculadas con las diferentes cepas bacterianas, se tomaron tres cajas de cultivo de 12 pozos con 1.5×10^5 CEM-GW y medio de expansión (DMEM + 10% LPh + 160 μ L de Heparina) con una confluencia del 50-60% por cada cepa bacteriana ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228, se removió el medio de cultivo y se lavó la monocapa de células dos veces con PBS 1X para acondicionar las células media hora antes de iniciar los ensayos se adiciono 800 μ L de medio DMEM (control negativo), 800 μ L a cada uno de los 12 pozos de DMEM + 1% LPh + 160 μ L de Heparina y se dejaron durante treinta minutos a 37°C, 5% CO₂. Pasado el tiempo de incubación se sacaron las cajas de cultivo y se inocularon con 20 a 50 UFC/mL de ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 en fase exponencial. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por un periodo de 18 h en agitación continua (Figura 10). A diferentes tiempos (0h, 6h y 18h) se realizó lavado por duplicado con 500 μ L de PBS 1X a cada pozo teniendo cuidado de no desprender las células y se extrajo ARN con el kit de extracción de ARN libre de ADN usando el kit comercial Quick-RNATM MiniPrep (R1055: Zymo Research®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocó 250 μ l de las muestras en tubos eppendorf de 2 ml, se agregó 175 μ l de buffer de lisado + BM, 350 μ l de buffer de dilución (RDA), se mezcló y se centrifugó. Se transvasó 750 μ l de sobrenadante resultante y se adicionaron 200 μ l de etanol al 95%, se mezcló empleando el vórtex. Luego se transfirió 700 μ l de la mezcla al cartucho preinsertado al tubo de colección del kit (SV Total RNA Isolation System). Se centrifugó a 12000 G por 15 segundos a temperatura ambiente. Se realizaron dos pasos de lavados y centrifugados, con los buffers del kit, para eliminar el debris celular. Se colocó el cartucho en el tubo de lavado del kit (SV Total RNA Isolation System). Se incubó con DNAsa, para eliminar el ADN y posteriormente, el RNA total obtenido de las muestras se cuantifico por Qubit® RNA Assay Kit (Q32852: Invitrogen®), antes de su almacenamiento a una temperatura de -70°C. Se realizaron diluciones para dejar todas las muestras en la misma concentración (70 ng/ μ L).3.14 Estandarización de la RT-PCR

Para evaluar la presencia de los genes hBD-1, LCN2 y HAMP se realizó una PCR utilizando el kit Luna Universal One-Step® Biolabs el cual se basa en colorantes de secuencias de ARN objetivo a través del canal de fluorescencia SYBR, la qPCR se montó en el equipo AB 7500® Fast, para cada reacción se utilizó 10 µL de Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X), 1 µL Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X), 0,3 µL de Forward primer, 0,3 µL de Reverse primer, 1 µL de mRNA y 207 µL Nuclease-free Water para un volumen final de 20 µL.

El perfil térmico usado en la PCR consto de los siguientes pasos: para la amplificación de ADNc se hizo un paso inicial de transcripción inversa a 55.0 °C durante 10 minutos seguido por un paso de desnaturalización a 95.0°C durante 1 minuto, 40 ciclos de amplificación con un ciclo inicial de apertura a 95.0°C durante 15 segundos, un anillamiento 63.0°C por un minuto y finalmente una elongación a 72.0°C por 30 segundos. Con los productos de amplificación de ADN resultante se hizo un gel de agarosa al 2.0 % teñido con SYBR Green, la lectura del gel se hizo en el foto-documentador Image Quant Las 500 GE®

3.10 Evaluación de la expresión proteica de AMPs en sobrenadantes de CEM-GW en cocultivo con cepas ATCC

Para la evaluación de la secreción de AMPs por parte de las CEM-GW sometidas a infección bacteriana, se tomaron 900 µL de sobrenadante de cajas de cultivo usadas para extracción de RNA a las 0h, 6h y 18 h con y sin inoculación bacteriana con cepas ATCC. Estos sobrenadantes fueron centrifugados durante 10 minutos a 1200 rpm para descartar detritos celulares y se almacenaron a -80°C.

Para la cuantificación de la expresión de las proteínas β-defensina-2, Lipocalina-2 y Hecpidina se utilizó la técnica cuantitativa de inmunoensayo en sándwich mediante el uso del kit comercial Quantikine® ELISA Human Hecpidin Immunoassay Catalog Number DHP250, Quantikine® ELISA Human Lipocalin-2/NGAL Immunoassay Catalog Number DLCN20 y Quantikine® ELISA Human DEFB1 (Defensin Beta 1) de la casa comercial R&D systems a biotechne brand. El primer paso que se realizo consistió en la preparación de cada uno de los reactivos que componian los diferentes kits, se

tomaron los sobrenadantes que se recolectaron en cada uno de los experimentos y que se encontraban almacenados a -80°C . Se procedió a montar el ensayo colocando en cada pozo los estándares, los controles y las muestras a determinar estas últimas se colocaron de forma directa sin realizar dilución previa en cada uno de los ensayos. Después de este paso se realiza la primera incubación, pasado el tiempo de incubación se procedió a lavar cada uno de los pozos se agregó el conjugado y se incubó nuevamente. Posteriormente se agregó la solución sustrato, la solución de parada y posteriormente se midió la intensidad del color de cada una de las placas de 96 pozos con el equipo Synergy HTX de la casa comercial Biotek para la obtención de los datos. Usando la curva de calibración para cada péptido, se obtuvo la concentración final de cada péptido en cada una de las condiciones analizadas.

3.11 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos se calcularon utilizando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), en el ANOVA se consideró que la diferencia entre los grupos tratados fue significativa cuando $P < 0.05$ (95% de confianza), los experimentos se realizaron por triplicado y los valores se expresaron como promedio \pm error estándar. El análisis estadístico se efectuó empleando el programa GraphPad Prism 6 y las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

4. Resultados y Discusión

4.1 Estandarizaciones curvas de crecimiento cepas ATCC y determinación fase exponencial

Inicialmente se realizó la estandarización de las curvas de crecimiento de las cepas ATCC se seleccionaron cuatro bacterias : ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228, las cuales según el informe de la OMS publicado en el mes de enero de 2018 pertenecen a las bacterias que están implicadas en provocar enfermedades graves a nivel intrahospitalario con un nivel alto de farmacorresistencia [1].

La estandarización de estas curvas de crecimiento fue fundamental para determinar la fase exponencial media de cada una de las cepas ATCC, debido a que en esta etapa toda la maquinaria bacteriana se halla activa realizando procesos de replicación, transcripción, traducción y síntesis de la pared celular encontrándose aumentada la tolerancia a los antimicrobianos [61, 62]. En las (Figuras 13, 14, 15 y 16) se puede observar la fase media exponencial de cada una de las cepas ATCC utilizadas en los ensayos cuando estas crecen en caldo BHI.

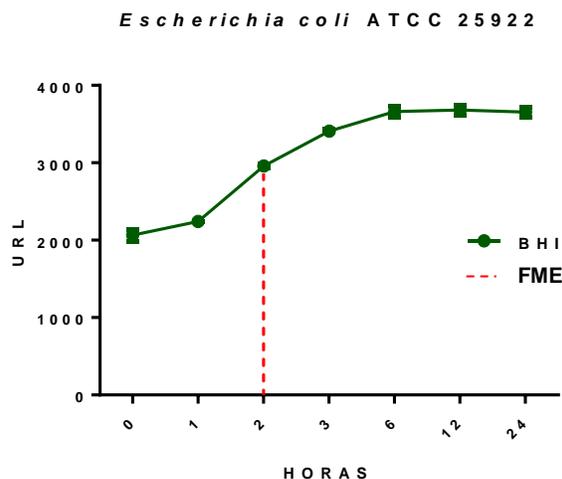


Figura 13: Curva de crecimiento bacteriano *Escherichia coli* ATCC 25922

En la Figura 13 observamos la fase media exponencial (FME) de la cepa ATCC *Escherichia coli* ATCC 25922 a las dos horas de incubación (línea roja) cuando esta crece en caldo BHI. Este resultado es consistente con los datos obtenidos previamente, en el estudio realizado por María Hincapié y colaboradores [66] quienes comprobaron la cinética de crecimiento de la *Escherichia coli*, encontrándose un FME equivalente a dos horas en condiciones experimentales similares.

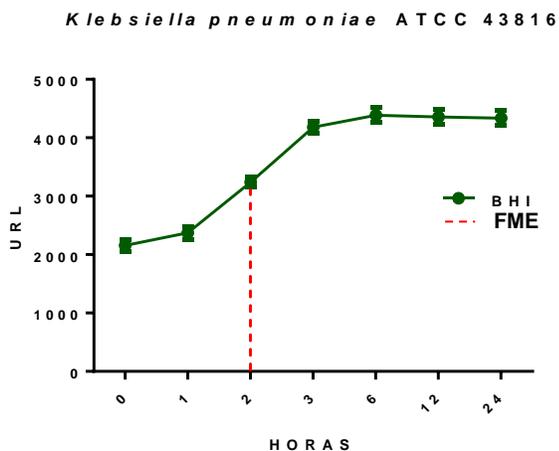


Figura 14: Curva de crecimiento bacteriano *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816.

De manera similar, cuando se realiza el cultivo de la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816, se observa que la FME de esta cepa en condiciones de crecimiento en caldo BHI corresponde a las dos horas de incubación (Figura 14, línea roja). Este tiempo ha sido previamente descrito por Janeth Arias y colaboradores [67], donde realizaron una curva de crecimiento para determinar la fase exponencial de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en caldo nutritivo, obteniendo resultados comprobables con los encontrados en este estudio.

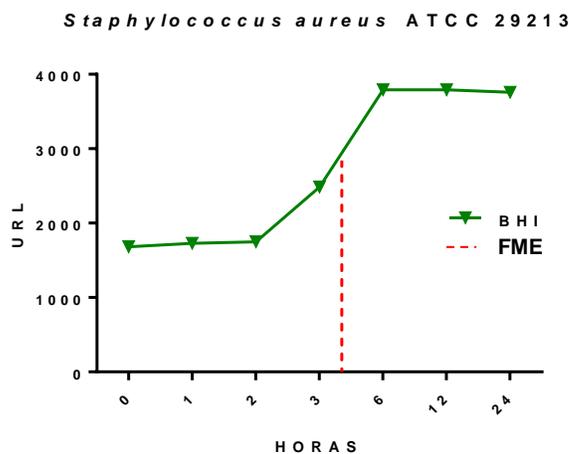


Figura 15: Curva de crecimiento bacteriano *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

En la Figura 15 se observa la cinética de crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y se indica el valor de la fase media exponencial (FME), el cual equivale a cuatro horas (línea roja). Este tiempo concuerda con lo descrito en el estudio realizado por Janeth Arias y colaboradores [67] bajo condiciones de crecimiento similares.

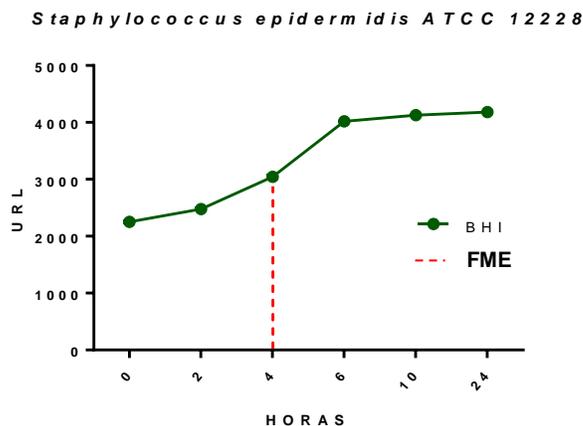


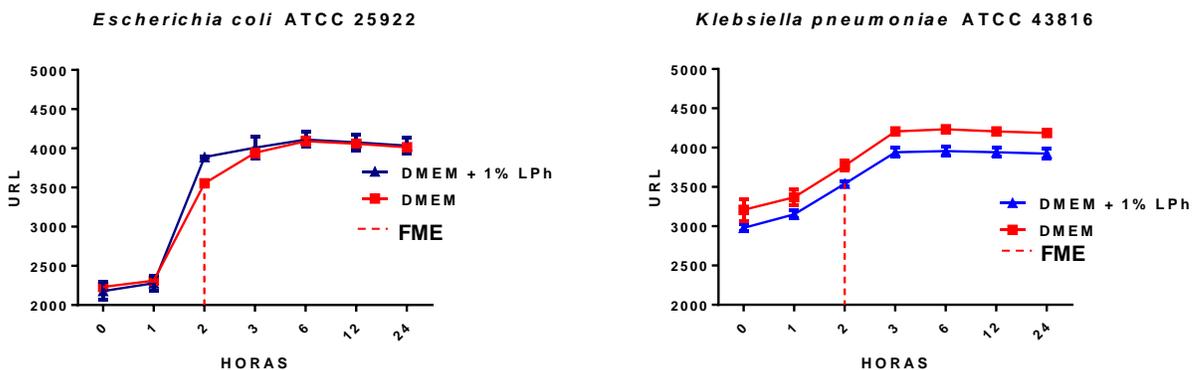
Figura 16: Curva de crecimiento bacteriano *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Finalmente, para la cepa bacteriana *Staphylococcus epidermidis*, y de manera similar a lo encontrado en el estudio realizado por Tao, Zhu en condiciones de crecimiento con medio nutritivo [68], se pudo observar una fase media exponencial (FME) a las cuatro horas de incubación (línea roja) en caldo BHI (Figura 16). En conclusión, las condiciones de cultivo

bacteriano estandarizadas en este estudio para las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 concuerdan con lo establecido previamente en estudios con abordajes metodológicos similares. Esto es importante porque permite avanzar a la siguiente fase de investigación bajo condiciones experimentales estándar para estas cepas bacterianas.

4.2 Curvas de crecimiento cepas ATCC en DMEM y DMEM/1% LPh

Es importante tener en cuenta que, para llevar a cabo el modelo experimental de infección bacteriana en CEM, las diferentes cepas bacterianas deben crecer en condiciones de cultivo propias de este tipo de célula eucariota. Por tanto, es indispensable determinar la cinética de crecimiento de las cepas bacterianas del presente estudio en los medios de cultivo de las CEM y corroborar que estas cepas pueden presentar tasas de crecimiento bacteriano comparables con la condición estándar en caldo BHI. Es así como conjuntamente a la determinación de la fase exponencial de las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 BHI, se realizó la curva de crecimiento de las cepas ATCC en medio DMEM sin suplemento y medio DMEM suplementado con 1% LPh. Como se observa en la Figura 17, las cuatro cepas bacterianas cultivadas en DMEM y DMEM con 1% LPh muestran cinéticas de crecimiento similar a las observadas con caldo BHI.



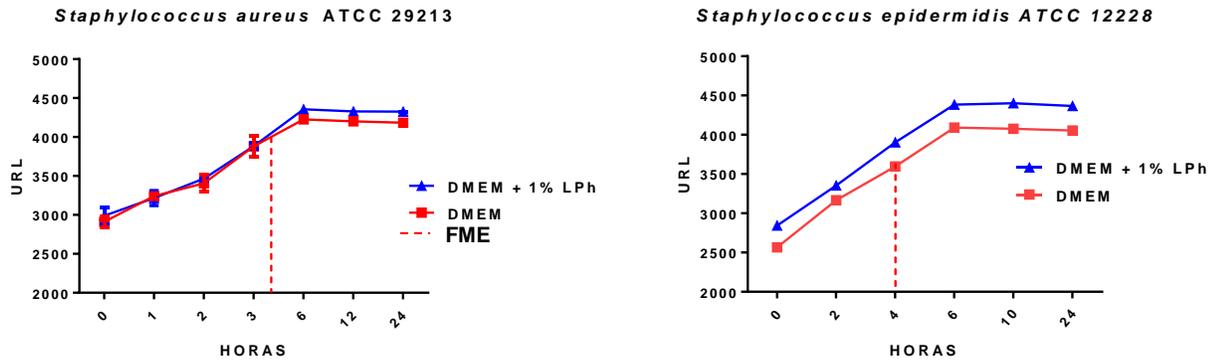


Figura 17: Curva de crecimiento bacteriano *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Esto se puede concluir al observar que los valores de FME de las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 inoculadas en medio DMEM sin suplemento y medio DMEM + 1% LPh corresponden a 2, 2, 4 y 4 horas respectivamente. Con estos resultados se evidencia que los valores de FME para el crecimiento bacteriano de cada una de las cepas ATCC es similar y por tanto se puede concluir que el DMEM y el DMEM con 1% del LPh soportan el crecimiento bacteriano de manera estándar. Adicionalmente no se encontró diferencias significativas cuando el DMEM contenía 1% de LPh en el medio, lo que indica que este suplemento no representa un factor de inhibición del crecimiento microbiano. En un estudio realizado por Anne Biedermann y colaboradores se demostró las interacciones bacterianas en un modelo experimental de infección en CEM aisladas de pulpa dental. En este estudio se pudo evidenciar la supervivencia de las cepas bacterianas en presencia de medio de cultivo celular, específicamente DMEM. Incluso se demostró que el suplemento con suero fetal bovino tampoco afectó la tasa de crecimiento bacteriano. A partir de los resultados obtenidos en este estudio se concluyó que el medio de cultivo DMEM y su suplemento es una fuente de crecimiento tanto para CEM como para bacterias propias del tejido o circulantes en el medio ambiente en el que se procesan las muestras [69]. El presente estudio se encuentra acorde con este hallazgo y provee nueva evidencia experimental en donde el medio DMEM y el suplemento de lisado plaquetario humano permite el crecimiento de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. epidermidis*.

4.3 Aislamiento y Caracterización de las CEM-GW

Para la realización del modelo experimental de infección bacteriana en CEM de GW, se evaluaron 3 líneas celular obtenidas a partir de cordones umbilicales donados y colectados por el programa de colecta CORDIAL del Banco de Sangre de Cordón Umbilical. El tejido del cordón umbilical de los tres donantes fue posteriormente procesado por personal de la Unidad de Terapias Avanzadas del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS).

El procesamiento de los tejidos del cordón incluyó la limpieza del cordón umbilical, su fragmentación y disección, con el fin de exponer y obtener la gelatina de Wharton previa remoción de vasos sanguíneos del cordón (venas y arteria). La GW obtenida para cada donante fue posteriormente sometida a disgregación mecánica y posterior colocación de los explantes en cajas de cultivo para su incubación bajo condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂ y 20% de O₂). Para cada donante se observó positividad de los cultivos tres a siete días después de este proceso, a partir de la observación de células adheridas a la superficie del plástico de la caja de cultivo, así como migración celular del explante. Cuando los explantes alcanzaron confluencia del 80% se efectuó el primer subcultivo, conteo celular, caracterización inmunofenotípica y criopreservación (Figura 18).

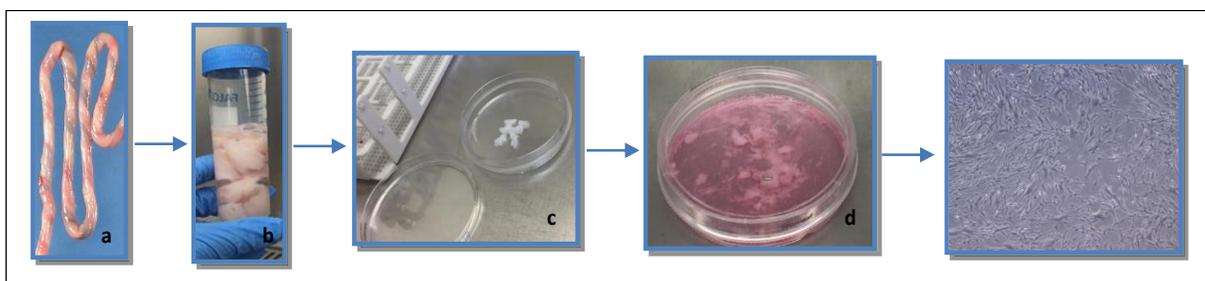


Figura 18: Esquema de aislamiento de CEM-GW de un donante usado en el presente estudio.

En la figura 18 se observa el procedimiento realizado para la de obtención de CEM-GW donde se aprecia el Cordón Umbilical donado (a), el proceso de lavado de los trozos de Cordón Umbilical resuspendidos en PBS 1X + Penicilina-Estreptomicina (b), la limpieza y exposición de la gelatina de Wharton para remoción de capilares (c) y el cultivo de los

fragmentos de gelatina de Wharton con medio DMEM suplementado con 10% LPh para aislamiento de CEM-GW (d). Una vez el cultivo es positivo se obtiene una capa de células uniformemente adheridas, viables y de morfología fibroblastoide.

Las CEM-GW usadas en cada uno de los ensayos cumplieron con todos los criterios que las clasifican como CEM según lo definido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular [74], uno de los parámetros que las identifican es su particular inmunofenotipo por esta razón se caracterizaron, el análisis se realizó mediante citometría de flujo donde se evidencio una baja expresión de los marcadores hematopoyéticos HLA-DR, CD34 y CD45 y una expresión mayor del 90% de los marcadores característicos de superficie de las CEM CD73, CD90 y CD105, los resultados obtenidos son compatibles con los descritos por Abraham Macías y colaboradores (Figura 19) [70].

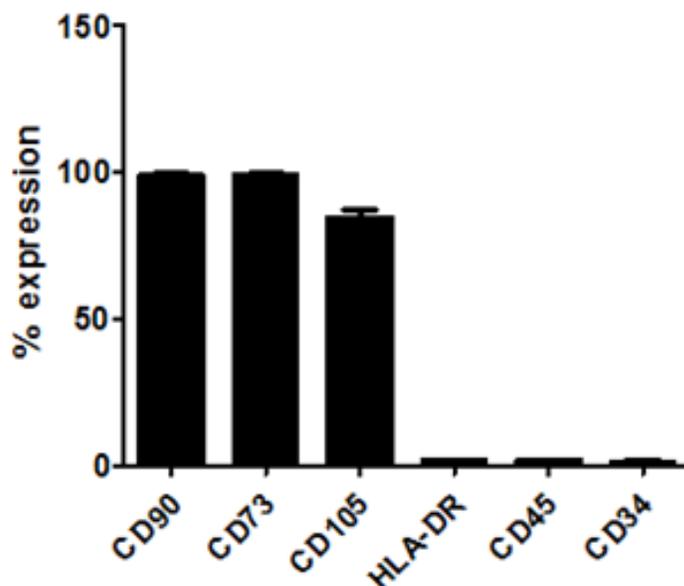
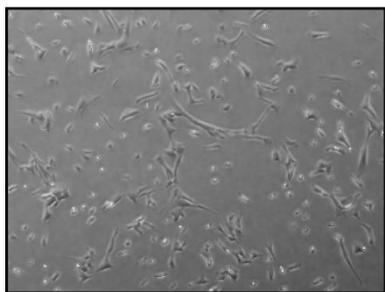


Figura 19: Expresión de marcadores de superficie de las CEM

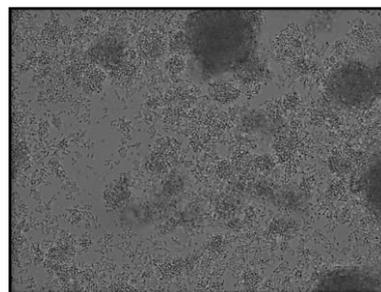
4.4 Estandarización del inóculo de cepas ATCC

Luego de comprobar que las cepas ATCC presentan cinéticas de crecimiento esperadas, y que el cultivo de las mismas en medio DMEM y medio DMEM suplementado con LPh

soportan su crecimiento a tasas similares a las condiciones estándar, se procedió a estandarizar el inóculo bacteriano necesario para el establecimiento del modelo experimental de infección bacteriana con CEM. Es importante determinar una dosis bacteriana adecuada que no indujera muerte temprana de las CEM, con el fin de tener una ventana experimental adecuada para la observación del potencial efecto antimicrobiano mediado por CEM. Para ello se procedió con la estandarización del inóculo, inicialmente tomando como referencia un número de UFC equivalente a 300 para la cepa bacteriana *E. coli*. Esta concentración se usó para inocular los cultivos de CEM previamente establecidas, por 24 horas. A esta dosis inicial (inóculo de 300 UFC) se obtuvo una muerte celular y pérdida del cultivo de CEM al cabo de dos horas post-inoculación (Figura 20).



CEM-GW control (sin *E. coli*) 2 horas post
inoculación



CEM-GW tratada (*E. coli*) 2 horas post
inoculación

Figura 20. Ensayo preliminar de infección con *E. coli* a cultivos de CEM

Con base en este ensayo preliminar se concluyó que una inoculación con más de 300 UFC es letal para las células y por lo tanto se procedió a encontrar una dosis bacteriana que permitiera la sobrevivencia celular por al menos 24 horas. Usando nuevamente la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 se realizaron diluciones seriadas a 150, 75 y 37.5. Se encontró finalmente una sobrevivencia de CEM-GW a 24 horas con el inóculo bacteriano correspondiente a 37,5 UFC. Por lo tanto, se estableció que el inóculo adecuado para el modelo de infección bacteriana estaría alrededor de 30 UFC para las cepas seleccionadas.

Para la obtención de inóculos de 30 UFC, se generaron diluciones seriadas para cada cepa, obteniéndose UFC/ml de 300 (dilución 10^{-6}) para la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922, 270 (dilución 10^{-6}) para ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816, 282 (10^{-5}) para la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 y 290 (10^{-5}) para la cepa ATCC *Staphylococcus*

aureus 29213. A partir de estas diluciones se procedió a confirmar el número de CFU a partir de siembra (en triplicado) por profundidad en agar LB de cada una de las cepas (100µl). Se pudo confirmar que en efecto había en promedio 32 UFC para la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 (experimento 1, Figura 21), 28 UFC para la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 (experimento 2), 29 UFC para la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 (experimento 3) y 38 UFC para la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 (experimento 4).

PROMEDIO INICIAL DE UFC/mL DE CEPAS ATCC

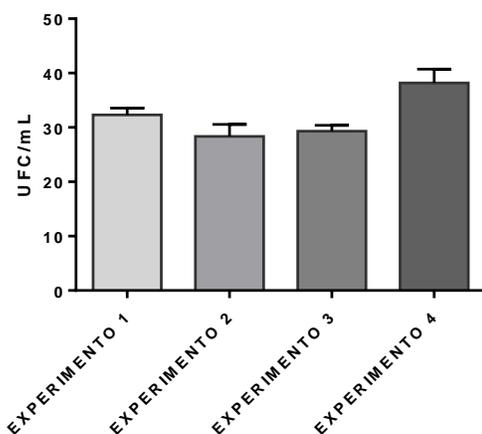
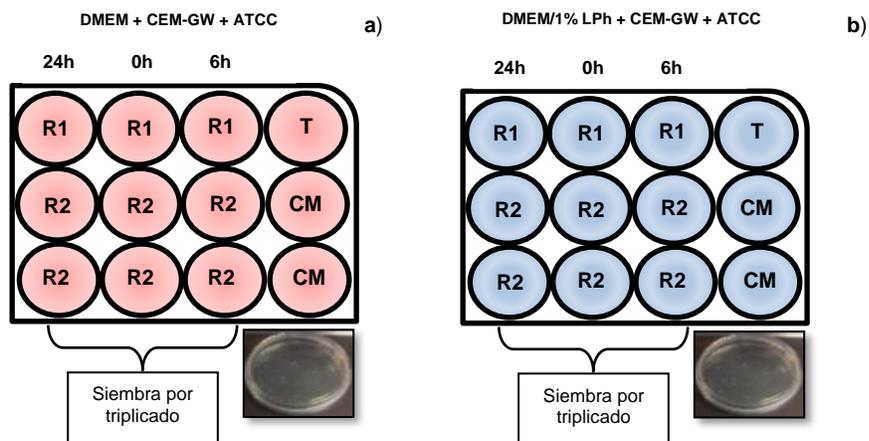


Figura 21: Recuento de UFC en 100 µL por método de profundidad en placa

Estos ensayos fueron realizados por triplicado y se muestran el promedio obtenido junto con su desviación estándar. Se puede evidenciar que el número de UFC obtenido para cada uno de los ensayos fue reproducible, lo que es fundamental para proporcionar las mismas condiciones en cada uno de los experimentos y de esta forma hacer consistente los datos obtenidos. El número de UFC inoculadas en cada experimento fue adecuado ya que permitió que las CEM-GW crecieran sin ser despegadas de la caja de cultivo al momento de ser infectadas permitiendo un contacto prolongado con las bacterias durante las 24 horas que duró este ensayo.

4.5 Estandarización del cocultivo de CEM-GW con las cepas ATCC

Con base en el proceso de estandarización previa tanto de los inóculos bacterianos como de los cultivos celulares de CEM, se procedió a diseñar el modelo experimental de infección bacteriana en CEM-GW (Figura 22). Para esto se sembraron cajas de cultivo de 12 pozos con los siguientes grupos experimentales: DMEM + CEM-GW + ATCC y DMEM/1% LPh + CEM-GW + ATCC. Como controles experimentales se utilizó cepas ATCC cultivadas con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh sin presencia de CEM-GW, esto con el fin de demostrar que la actividad antimicrobiana dependía de la presencia de las CEM-GW (grupos DMEM + ATCC y DMEM/1% LPh +ATCC, Figura 22), como controles se utilizó CEM-GW crecidas en medio DMEM sin suplemento y cepas ATCC cultivadas con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh sin presencia de CEM-GW, esto con el fin de demostrar que la actividad antimicrobiana dependía de la presencia de las CEM-GW y no por las condiciones de cultivo. Es importante mencionar que el diseño experimental propuesto en este trabajo incorpora el LPh como suplemento del medio de crecimiento, debido a que el cultivo de CEM de GW se encuentra establecido con este suplemento y en un futuro se espera utilizar este producto en terapias celulares. Es así como el suplemento con LPh evita potenciales reacciones inmunes deletéreas asociadas al uso de suplementos que no son de origen humano [74].



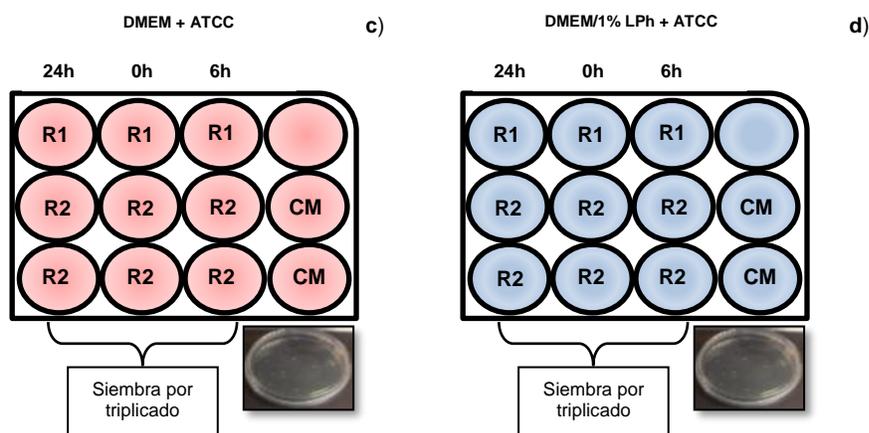


Figura 22: Esquema de estandarización de inoculación de CEM-GW con cepas ATCC

También se estableció que existiera una concentración homogénea de CEM-GW sembradas para cada grupo experimental para asegurar que el cocultivo de las CEM-GW con las cepas ATCC tuviera las mismas condiciones en cada experimento. Aquí es importante mencionar que las CEM-GW deben ser inoculadas con las bacterias cuando estén dentro de un 50 a 60% de confluencia, lo que favorece el contacto directo entre sí permitiendo censar las bacterias presentes en el medio para que se produzcan los péptidos antimicrobianos [66]. Si al realizar los experimentos cuando las CEM-GW están en una confluencia mayor del 60%, se incrementa el riesgo de que pierdan sus propiedades de adhesión celular y sus potenciales propiedades antibacterianas al final del experimento, esto es, a las 24 horas.

Para la estandarización del número de CEM-GW se sembraron 5×10^4 CEM-GW en pase 4 por pozo, en placas de 12 pozos, en condiciones similares a las descritas previamente en el estudio realizado por Rebecca Harman y colaboradores [66] donde se evaluó el efecto de CEM aisladas de equino en el crecimiento de especies bacterianas gramnegativas y grampositivas. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C , 5% CO_2 hasta alcanzar una confluencia del 50-60%, y una vez allí, se trypsinizó un pozo de cada placa de cultivo y se realizó recuento celular con azul de tripano en cámara de Neubauer (Pozo "T", (Figura 23). El resto de los pozos fueron inoculados en este momento con las diferentes cepas bacterianas para comenzar la fase de infección experimental bacteriana.

PROMEDIO INICIAL DE CEM-GW POR EXPERIMENTO

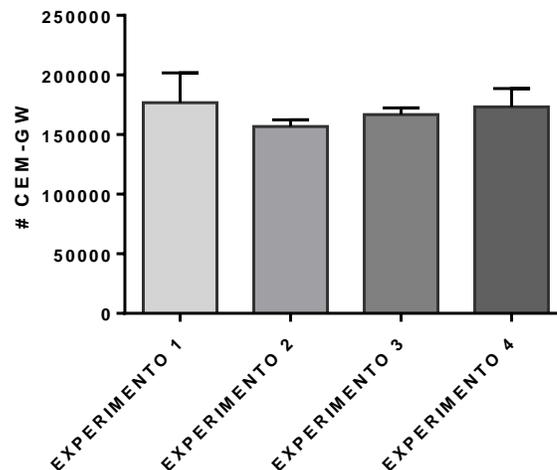


Figura 23: Promedio de CEM-GW sembradas en cuatro ensayos independientes previa inoculación con cepas ATCC

En la figura 19 se muestran el promedio (y desviaciones estándar) de CEM-GW recolectadas por tripsinización de cada pozo. El número de CEM-GW. El (experimento 1) corresponde al número de CEM-GW sembradas e inoculadas con cepa ATCC *Escherichia coli* 25922, el (experimento 2) el número de CEM-GW sembradas e inoculadas con cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816, el (experimento 3) el número de CEM-GW sembradas e inoculadas con cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 y el (experimento 4) el número de CEM-GW sembradas e inoculadas con cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213. Como se puede concluir, a esta confluencia (50-60%) se observa que en promedio se encontraban entre 1.5×10^5 y 2×10^5 CEM-GW por pozo. Los experimentos fueron realizados por triplicado con células de tres donantes distintos, mostrando homogeneidad en el número de CEM-GW previa inoculación con las diferentes cepas ATCC. A partir de este diseño experimental se realizó la toma de muestras de sobrenadante a las 0h, 6h y 24h por triplicado para posterior siembra por profundidad en Agar LB y recuento de UFC/mL (**R1**, **R2** y **R3** son replicas 1, 2 y 3 respectivamente, **CM** fueron los pozos para control del medio el cual no se inoculo con la cepa ATCC, se usaron 3 donantes de CEM-GW). Adicionalmente del mismo sobrenadante se realizó la cuantificación de la producción de péptidos antimicrobianos. Las CEM-GW remanentes en

el pozo de todas las condiciones experimentales, fueron cosechadas y se procedió a aislar el RNA total para posteriores ensayos de expresión génica.

4.6 Efecto de las CEM-GW en el crecimiento bacteriano de cepas ATCC

Teniendo en cuenta que se usaron tres donantes de CEM-GW (UCWJ-85, UCWJ-91 y UCWJ-113), inicialmente se tomaron fotografías microscópicas (5X) con el fin de observar la morfología y el crecimiento celular una vez fueron inoculadas con cepas ATCC en medio DMEM y DMEM suplementado con 1% de LPh (0, 6 y 24 horas post-inoculación).

4.6.1 CEM-GW en cultivo con ATCC *Escherichia coli* 25922

En la figura 24 se observa que las CEM-GW del donante UCWJ-85 inoculadas con la cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922 a las 0h con DMEM + 1% LPh y con DMEM sin suplemento se encuentran en un porcentaje de confluencia similar (50% aproximadamente) y alta viabilidad celular. Pasadas seis horas de inoculación bacteriana, se mantienen adecuadas viabilidades celulares junto con un aumento en la confluencia en el pozo con CEM-GW con DMEM + 1% LPh como en el pozo con CEM-GW más DMEM sin suplemento. Sin embargo, a las 24 horas de inoculación el pozo con CEM-GW con DMEM/1% LPh presenta una confluencia cercana al 100% mientras que las CEM-GW en cultivo con DMEM sin suplemento no evidencia células viables y si la presencia de detritos celulares (flechas).

Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

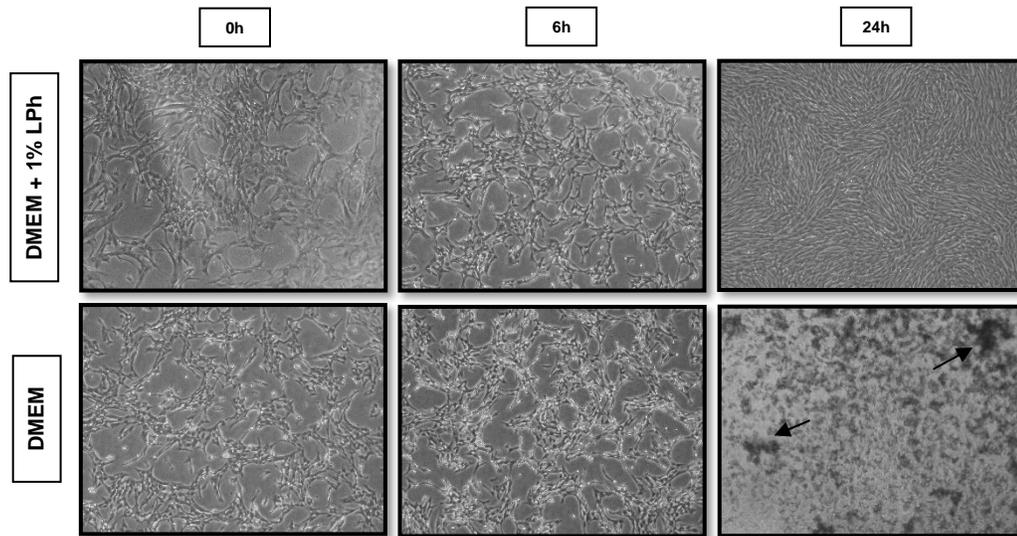


Figura 24: CEM-GW UCWJ-85 - ATCC *Escherichia coli* 25922

Similarmente, para el donante UCWJ-91 (Figura 25) se observa un porcentaje de confluencia similar y alta viabilidad a las 0 y 6 horas post-inoculación bacteriana, pero una pérdida total de la viabilidad celular y acumulación de detritos celulares (indicados con las flechas negras) en el grupo de DMEM sin suplemento de LPh, comparado al grupo con DMEM + 1% LPh a las 24 horas de infección bacteriana.

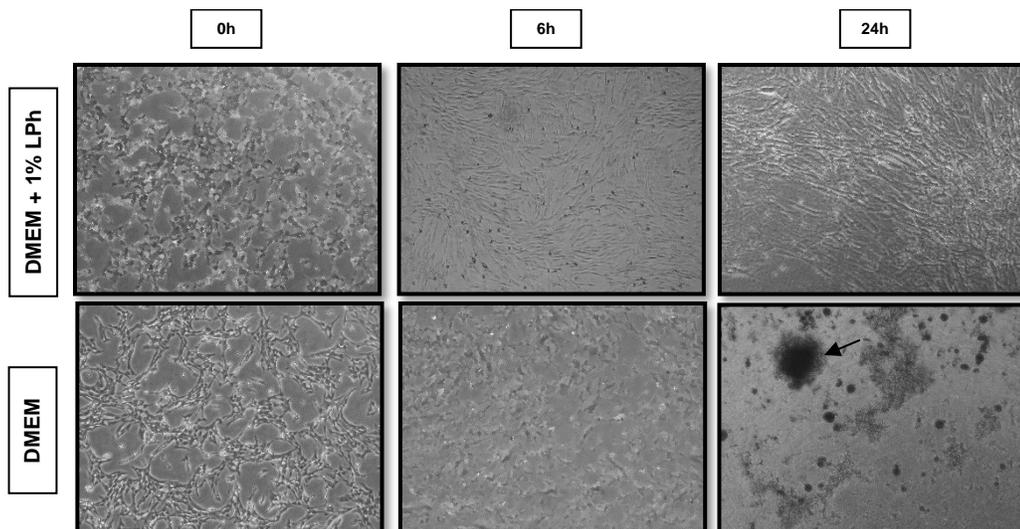


Figura 25: CEM-GW UCWJ-91 - ATCC *Escherichia coli* 25922

Finalmente, para el donante UCWJ-113 (Figura 26), se observa el mismo patrón de pérdida total de viabilidad celular en las CEM-GW inoculadas con cepa ATCC de *Escherichia coli* 25922 a las 24 horas, en el grupo de DMEM sin la presencia de 1% LPh. Tomando estos resultados en conjunto, podemos concluir que las CEM-GW inoculadas con ATCC *Escherichia coli* 25922 en presencia de medio de cultivo DMEM + 1% LPh mantienen el crecimiento celular asociado a una alta viabilidad celular a pesar de la infección bacteriana.

Por lo contrario, la ausencia de lisado plaquetario humano en el medio de cultivo durante la fase de infección activa induce la pérdida del crecimiento celular y la muerte celular. Es entonces posible pensar que las CEM-GW en presencia de LPh logran controlar el crecimiento bacteriano a diferencia de las CEM-GW cultivadas en medio DMEM sin suplemento lo que provee una evidencia de la dependencia de LPh en el crecimiento CEM-GW.

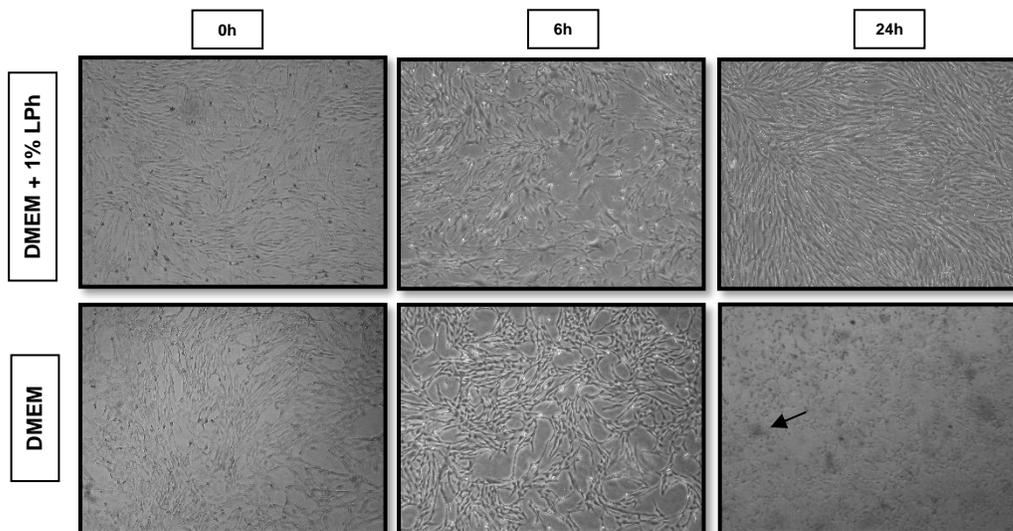


Figura 26: CEM-GW UCWJ -113 - ATCC *Escherichia coli* 25922

4.6.2 CEM-GW en cultivo con ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

En una configuración similar a la realizada para la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922, para la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 se usaron tres donantes de CEM-GW (UCWJ-85, UCWJ-91 y UCWJ-113) y se tomaron fotografías microscópicas (5X) con el fin de

observar el comportamiento de las CEM-GW al ser inoculadas en medio DMEM y DMEM suplementado con 1% de LPh a las 0,6 y 24 horas de incubación. Se evidenciaron los siguientes cambios (Figura 27 a 29)

Se observa en la Figura 27 que las CEM-GW del donante UCWJ-85 inoculadas con la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 a las 0h con DMEM + 1% LPh y con DMEM sin suplemento se encuentran en un porcentaje de confluencia similar (40% aproximadamente) además las células muestran una alta viabilidad. Luego de seis horas de incubación de las CEM-GW con la cepa bacteriana, esta viabilidad se mantiene al mismo tiempo que aumenta la confluencia del pozo con CEM-GW con DMEM + 1% LPh como en el pozo con CEM-GW más DMEM sin suplemento. A las 24 horas de inoculación el pozo con CEM-GW cultivados en DMEM/1% LPh presenta una confluencia cercana al 100% y las células mantienen alta viabilidad, mientras que las CEM-GW en cultivo con DMEM sin suplemento, no muestran la misma confluencia (<80%) y se puede observar la presencia de detritos celulares, lo que indica muerte celular activa.

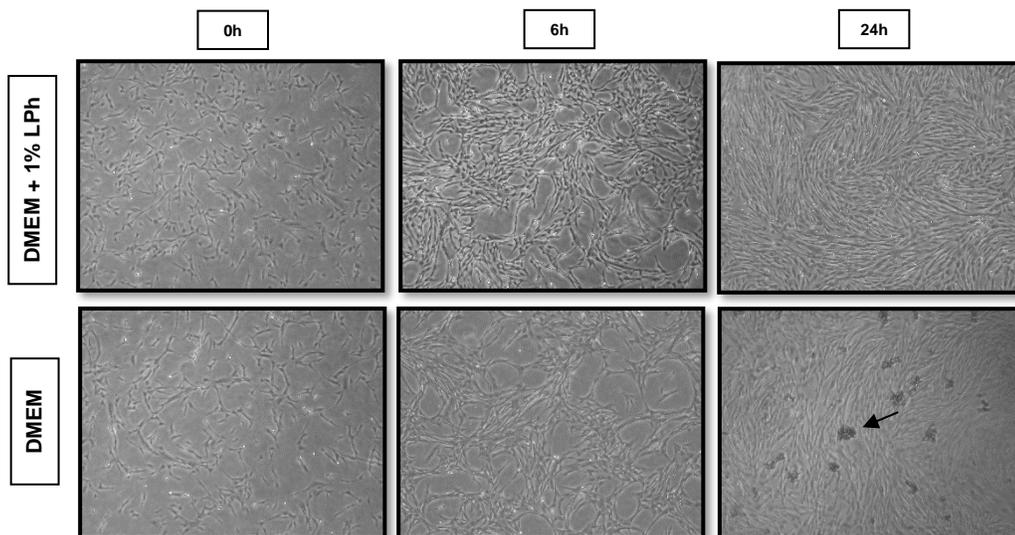


Figura 27: CEM-GW UCWJ -85 - ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

De forma similar, para el donante UCWJ-91 (Figura 28) se observa un porcentaje de confluencia y alta viabilidad a las 0 y 6 horas post-inoculación bacteriana, pero se evidencia una pérdida de la viabilidad celular asociada a la acumulación de detritos celulares en el grupo de DMEM sin suplemento de LPh, comparado al grupo con DMEM + 1% LPh a las 24 horas de infección bacteriana.

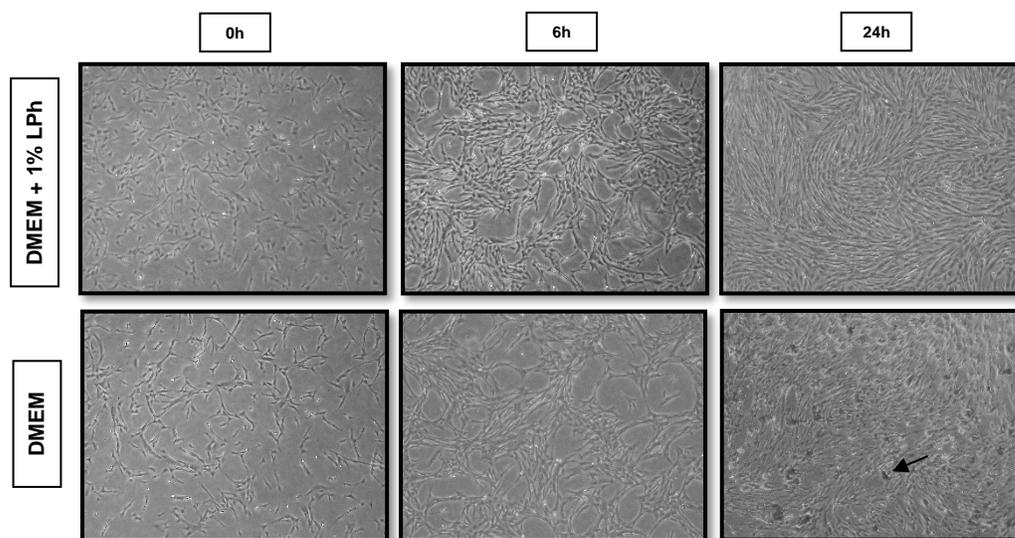


Figura 28: CEM-GW UCWJ-91 - ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

Por último, para el donante UCWJ-113 (Figura 29), se observa también disminución de la confluencia y pérdida de viabilidad celular en las CEM-GW inoculadas con la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 a las 24 horas, en el grupo de DMEM sin la presencia de 1% LPh. De manera general se puede concluir que las CEM-GW inoculadas con ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 en presencia de medio de cultivo DMEM + 1% LPh mantienen el crecimiento celular asociado a una alta viabilidad celular a pesar del inoculo bacteriano durante el tiempo de infección bacteriana.

Por lo contrario, durante infección con *K. pneumoniae*, la ausencia de LPh en el medio de cultivo retarda el crecimiento celular y parece favorecer la muerte celular de CEM-GW. Si bien el efecto observado sobre las CEM-GW en presencia de infección por *K. pneumoniae* no es comparable con el efecto identificado en *E. coli*, también podemos concluir que las CEM-GW en presencia de LPh logran controlar el crecimiento y la viabilidad celular durante la infección bacteriana.

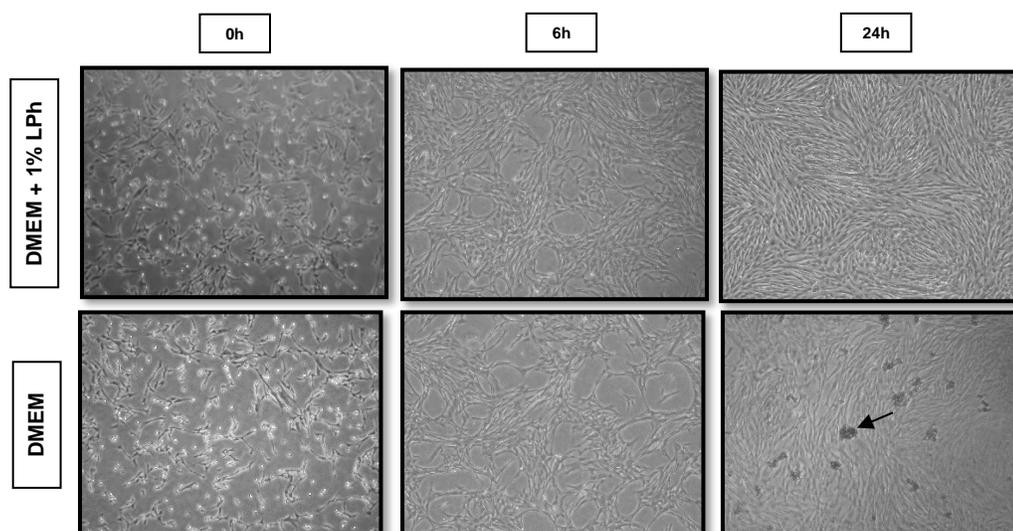


Figura 29: CEM-GW UCWJ-113 - ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

4.6.3 CEM-GW en cultivo con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

El comportamiento de las CEM-GW inoculadas con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 se puede observar en las Figuras 30, 31 y 32 para los donantes UCWJ-85, UCWJ-91 y UCWJ-113. Para el caso del donante UCWJ-85, se evidencia que las CEM-GW inoculadas con la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 a las 0h con DMEM + 1% LPH y con DMEM sin suplemento se encuentran en un porcentaje de confluencia similar (40% aproximadamente) además se observa que las células poseen una alta viabilidad (Figura 30).

Luego de seis horas de incubación de las CEM-GW con la cepa bacteriana, esta viabilidad se mantiene al mismo tiempo que aumenta la confluencia del pozo con CEM-GW con DMEM + 1% LPH como en el pozo con CEM-GW más DMEM sin suplemento. No obstante, posterior a las 24 horas de inoculación el pozo con CEM-GW con DMEM/1% LPH presenta una confluencia cercana al 100% mientras que las CEM-GW en cultivo con DMEM sin suplemento, aunque las células también presentan reducida confluencia (<80%) y se pueden observar acúmulos de detritos celulares.

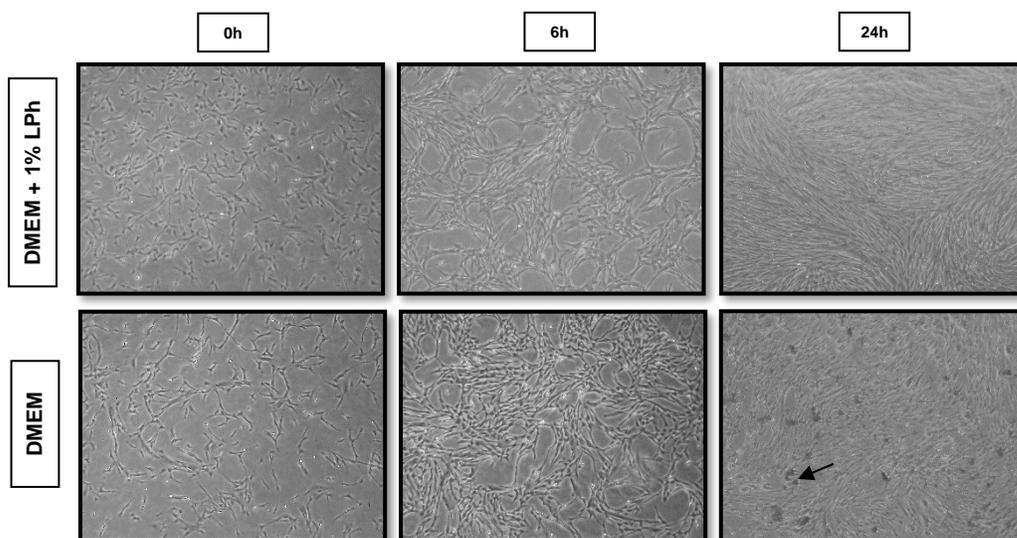


Figura 30: CEM-GW UCWJ -85 - ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

Para el donante UCWJ-91 (Figura 31) se evidencia un porcentaje de confluencia y alta viabilidad a las 0, 6 y 24 horas luego de la inoculación de la cepa bacteriana. Sin embargo se puede observar acumulación moderada de detritos celulares en el grupo de DMEM sin suplemento de LPh, comparado al grupo con DMEM + 1% LPh a las 24 horas de inoculación con la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213.

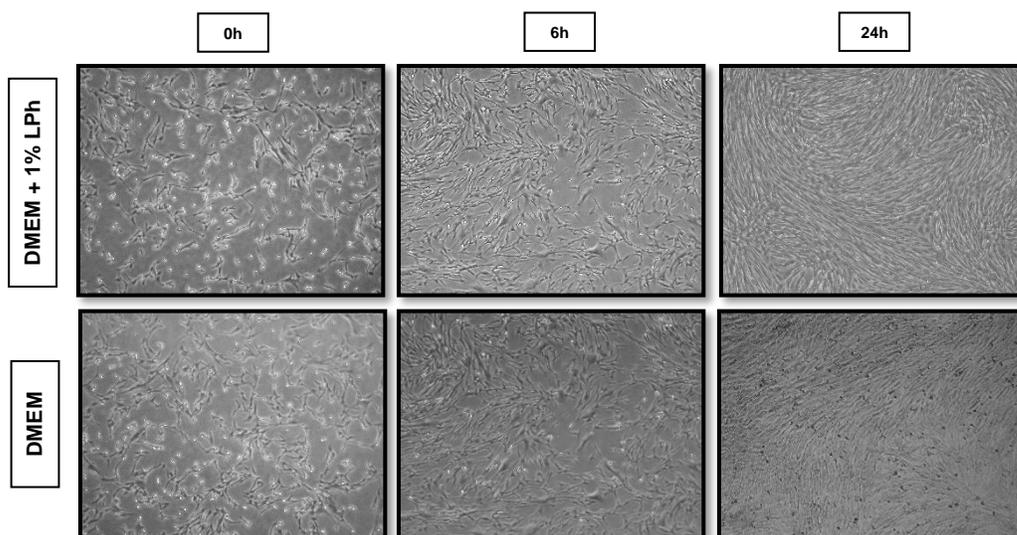


Figura 31: CEM-GW UCWJ -91 - ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

En la Figura 32, se muestran los resultados obtenidos para el donante UCWJ-113, donde se observa el mismo comportamiento de formación de cúmulos de detritos celulares en las CEM-GW inoculadas con la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 a las 24 horas, en el grupo de DMEM sin la presencia de 1% LPh. Adicionalmente se puede observar una marcada reducción de la confluencia celular en el grupo de CEM-GW cultivado en DMEM sin suplemento. En conclusión, las CEM-GW inoculadas con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 en presencia de medio de cultivo DMEM + 1% LPh pueden mantener el crecimiento celular y alta viabilidad a pesar del inóculo bacteriano. Sin embargo, la ausencia de suplemento de LPh induce la pérdida del crecimiento celular y la muerte celular de CEM-GW durante la fase de infección activa. Nuevamente, este fenómeno es consistente con lo observado previamente durante la infección de *K. pneumoniae* y *E. coli* en el modelo experimental de infección bacteriana presentado.

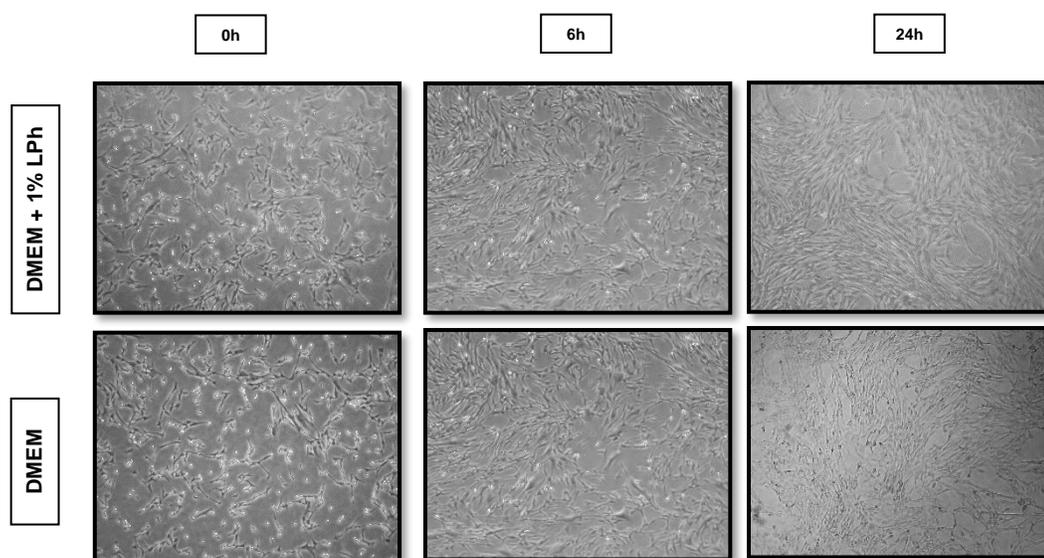


Figura 32: CEM-GW UCWJ -113 - ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

4.6.4 CEM-GW en cultivo con ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

Para la infección experimental son *S. epidermidis*, las CEM-GW (donantes UCWJ-85, UCWJ-91 y UCWJ-113) inoculadas con ATCC 12228 mostraron el siguiente

comportamiento luego de 0,6 y 24 horas de incubación con medio de cultivo DMEM suplementado con 1% de LPh y medio DMEM sin suplemento (Figuras 33 a 35).

En la Figura 33 se observan las CEM-GW del donante UCWJ-85 inoculadas con la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* a las 0h con DMEM + 1% LPh y con DMEM sin suplemento se encuentran en un porcentaje de confluencia similar (50% aproximadamente) además se observa que las células poseen una alta viabilidad. Hallazgo similar se evidencia luego de seis horas de incubación de las CEM-GW con la cepa bacteriana y se mantiene a lo largo del tiempo tanto en CEM-GW cultivadas en DMEM + 1% LPh como en DMEM sin suplemento hasta alcanzar 24 horas de cultivo post-inoculación (confluencia cercana al 100%). A diferencia de las otras cepas bacterianas, la infección experimenta de CEM-GW con *S. epidermidis* no afecta el cultivo celular (en crecimiento y viabilidad).

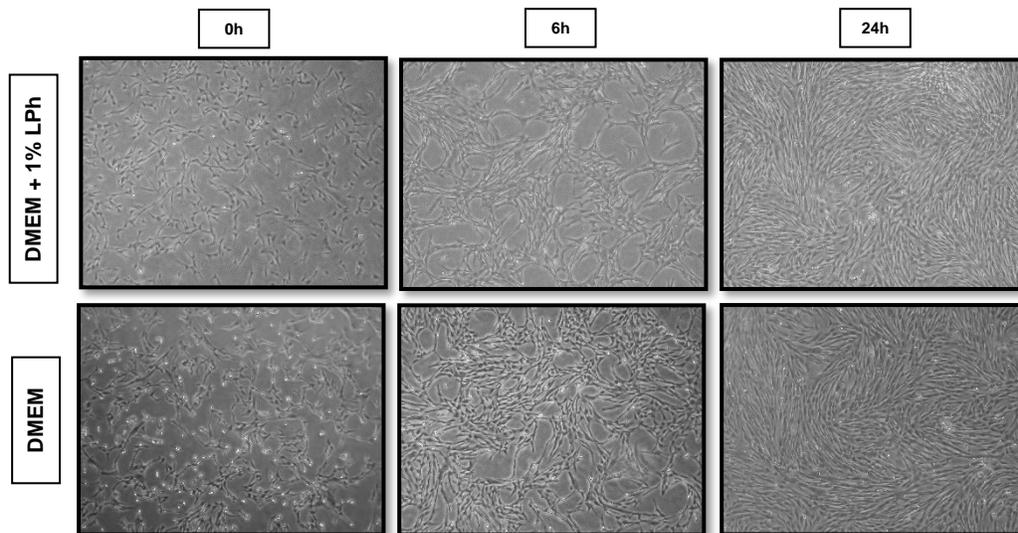


Figura 33: CEM-GW UCWJ -85 - ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

Para el donante UCWJ-91 (Figura 34) se evidencia similarmente un porcentaje de confluencia y alta viabilidad a las 0, 6 horas luego de inocular la cepa bacteriana ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228, tanto en el grupo de CEM-GW crecidas en DMEM sin suplemento de LPh, como el grupo de CEM-GW con DMEM + 1% LPh. Se observa una clara disminución de la confluencia celular en las CEM-GW en presencia de DMEM sin LPh, indicando un posible retraso en el crecimiento celular inducido por la bacteria.

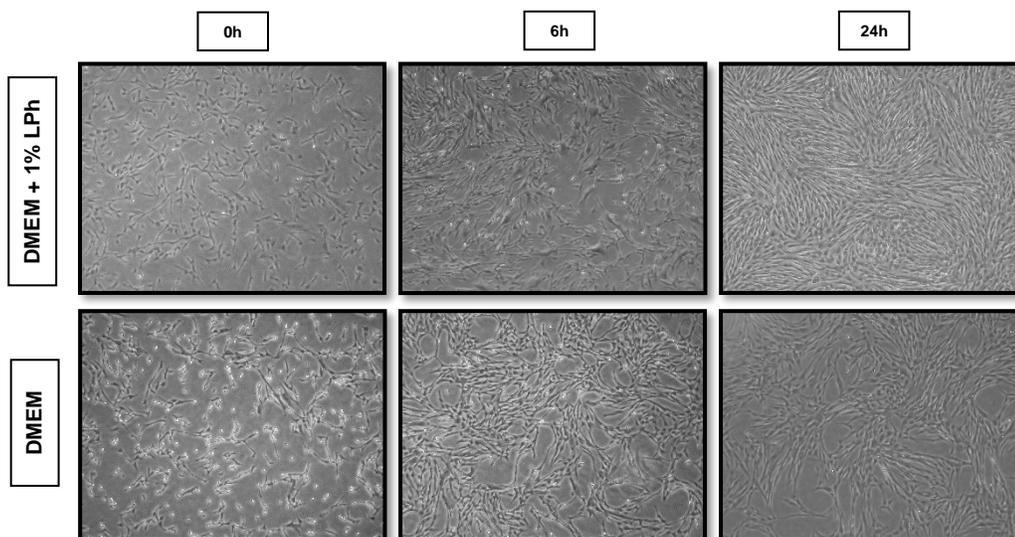


Figura 34: CEM-GW UCWJ -91 - ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

Por último, para el donante UCWJ-113 (Figura 35), se observa el mismo patrón de observado para los anteriores donantes, con viabilidades celulares preservadas en las CEM-GW inoculadas con la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 a las 0,6 y 24 horas tanto en el grupo de DMEM sin la presencia de 1% LPh como en el grupo de CEM-GW crecidas en medio DMEM con 1% LPh. En este donante sin embargo se observa una pérdida leve de la confluencia celular, pero a una magnitud menor a la observada para otros donantes y otras cepas bacterianas.

Tomando estos resultados en conjunto, se puede concluir que las CEM-GW inoculadas con ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 en presencia de medio de cultivo DMEM + 1% LPh y DMEM sin suplementó no afectaron dramáticamente el crecimiento y la viabilidad celular a pesar de la presencia de la bacteria.

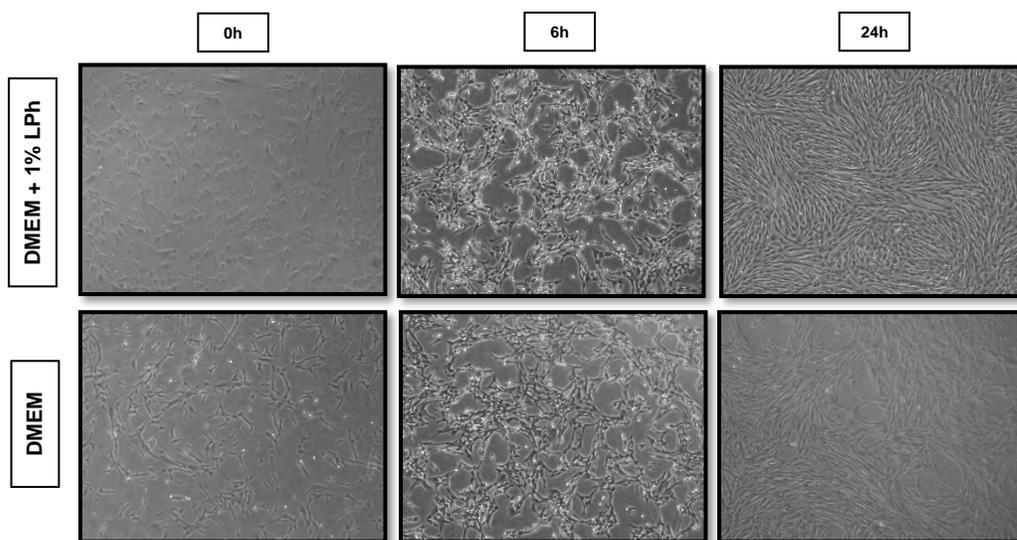


Figura 35: CEM-GW UCWJ -113 - ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

En esta fase de la investigación, podemos concluir que el suplemento del medio DMEM con LPh (1%) soporta el crecimiento y viabilidad de las CEM-GW. Esto podría favorecer la expresión de factores de crecimiento y sobrevida celular durante una infección activa, promoviendo su desarrollo y brindando las herramientas para desfavorecer el crecimiento bacteriano [71]. Los hallazgos presentados se evidenciaron de menor a mayor grado generalizadamente en las CEM-GW inoculadas con todas las cepas ATCC. Para el caso de la cepa *Escherichia coli* 25922 se encontró una dramática dependencia al suplemento del medio de cultivo, para las cepas *Klebsiella pneumoniae* 43816 y *Staphylococcus aureus* 29213 esta dependencia fue moderada y para la cepa *Staphylococcus epidermidis* 12228 la presencia o ausencia de LPh no impactó en la sobrevida y crecimiento celular. Seguidamente el estudio se enfocó en el análisis del crecimiento bacteriano durante el ensayo de infección experimental de CEM-GW. Para ello se tomaron muestras por triplicado del sobrenadante a las 0,6 y 24 horas de incubación y se procedió a la realización de curvas de crecimiento bacteriano a partir del conteo de UFC/mL (por siembra en agar LB por profundidad).

4.7 Evaluación de las curvas de crecimiento bacteriano cepas ATCC

Con el fin de establecer el efecto inhibitorio que ejercen las CEM-GW al ser inoculadas con las cepas ATCC se realizaron curvas de crecimiento bacteriano utilizando CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1% LPh. Como controles experimentales se utilizaron las cepas ATCC cultivadas en medio DMEM suplementado con 1% de LPh y DMEM solo sin la presencia de CEM-GW. La significancia estadística se evaluó mediante el test de ANOVA (nivel de significancia en $p < 0,05$)

4.7.1 Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC *Escherichia coli* 25922

Para la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 se observa un crecimiento bacteriano en los medios DMEM suplementado con 1% de LPh y DMEM sin suplemento, lo cual se esperaba considerando los ensayos de crecimientos realizados anteriormente (Figura 17). En esta configuración experimental *Escherichia coli* presentó un crecimiento exponencial en ambos medios de cultivo. De manera remarcable, la presencia de CEM-GW cultivadas en DMEM con suplemento de LPh inhibió significativamente el crecimiento bacteriano de la cepa a las 24 horas de incubación (punto 24 horas, $p < 0.0001$) al comparar las UFC obtenidas para *E. coli* en DMEM y DMEM/1% LPh. Es interesante anotar que en los sobrenadantes de las CEM-GW cultivadas en medio DMEM se observó un incremento de las UFC con respecto a los grupos con *Escherichia coli* cultivadas en DMEM y DMEM/1%LPh. Esto sugiere un favorecimiento del crecimiento en ausencia de LPh a pesar de la presencia de las CEM-GW durante la infección.

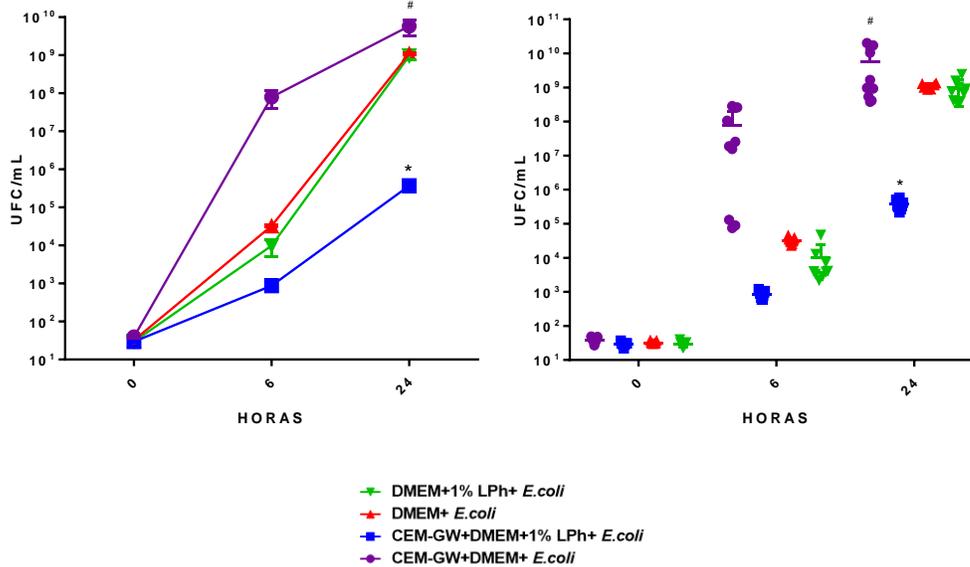


Figura 36: Curvas de crecimiento bacteriano *E. coli* ATCC 25922 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh. * = CEM-GW+DMEM+1%LPh+*E. coli* vs. demás grupos; # = CEM-GW+DMEM+*E. coli* vs. demás grupos

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que *E. coli* presenta un alto crecimiento tanto en los medios de cultivo control como en el grupo experimental de CEM-GW en medio DMEM sin suplemento, mientras que se evidencia una inhibición del crecimiento en el grupo donde las CEM-GW están en cultivo con el suplemento LPh. Esta observación es consistente con lo obtenido previamente en donde las CEM-GW cultivadas con DMEM/1%LPh e inoculadas con la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 mantienen su crecimiento y viabilidad celular, mientras que las CEM-GW con medio DMEM sin suplemento evidencian letalidad. Estos resultados son concordantes con los hallazgos de Krasnodembskaya, A y colaboradores, donde investigaron el efecto antimicrobiano que ejercen las CEM humanas sobre aislamientos de *Escherichia coli*. Su estudio concluye que la inoculación de cepas de *Escherichia coli* en CEM humanas inducen inhibición considerablemente el crecimiento bacteriano [51]. Sin embargo, en el presente estudio se identifica al lisado plaquetario humano como componente esencial en el efecto inhibitorio del crecimiento de *E. coli*, mediado por las CEM-GW.

4.7.2 Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

Seguidamente se analizó la cinética de crecimiento bacteriano en el presente modelo experimental para la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816. En la figura 37, se muestra que el crecimiento bacteriano fue similar en las condiciones control (medio DMEM suplementado con 1% de LPh y DMEM sin suplemento) a las 0, 6 y 24 horas y corresponde a lo observado previamente para esta cepa durante el proceso de estandarización. Sin embargo, la presencia de CEM-GW cultivadas con DMEM + 1% LPh indujo una reducción significativa del crecimiento bacteriano de *Klebsiella pneumoniae*, la cual se evidenció tempranamente (6 horas de inoculación, $p < 0.0001$) y se mantuvo hasta las 24 horas ($p < 0.0001$). Nuevamente la ausencia de LPh en el medio de cultivo de CEM-GW permitió el normal crecimiento de la bacteria. Observándose niveles de UFC similares a los obtenidos en los controles de la cepa ATCC 43816 cultivada en medio DMEM suplementado con 1% de LPh y DMEM sin suplemento a las 0,6 y 24 horas.

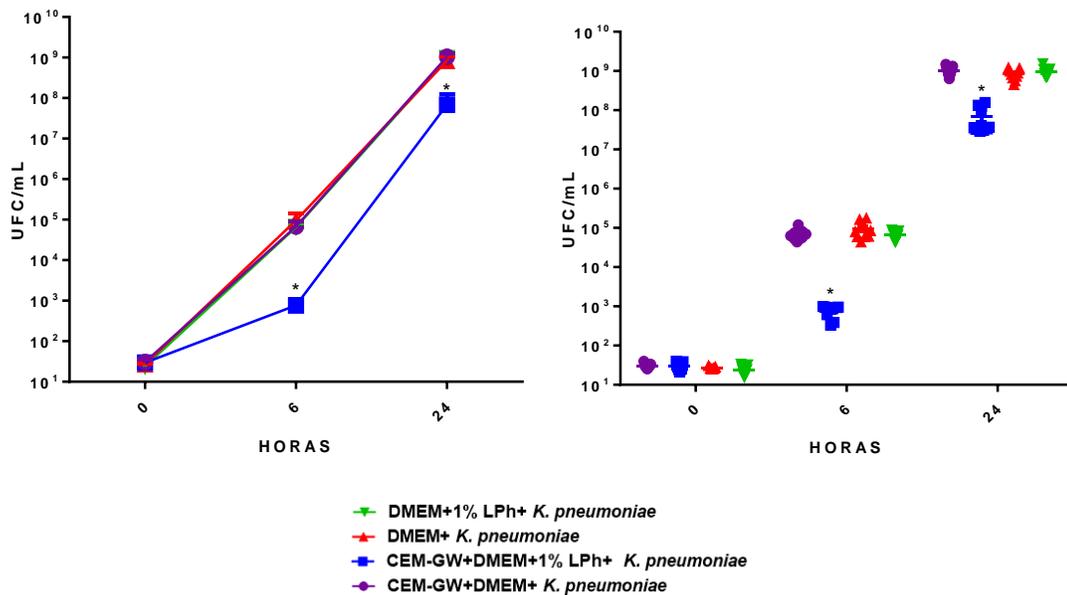


Figura 37: Curvas de crecimiento bacteriano ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh * = CEM-GW+DMEM+1%LPh+*K. pneumoniae* vs. demás grupos

Estos resultados soportan la observación microscópica donde las CEM-GW cultivadas con DMEM/1%LPh e inoculadas con la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 mantienen su confluencia (100%) y viabilidad, mientras que las CEM-GW en medio DMEM sin suplemento revelaron reducción del crecimiento celular (80% confluencia) y alteración en la viabilidad.

Hay que resaltar que los resultados obtenidos para *K. pneumoniae* son similares a los observados previamente para *Escherichia coli* y apuntan nuevamente a un efecto inhibitorio de las CEM-GW que está presente únicamente cuando estas células son cultivadas con suplemento de LPh. Adicionalmente, por primera vez este trabajo aporta evidencia de un efecto inhibitorio del crecimiento in vitro de la bacteria *K. pneumoniae* que es mediado por células mesenquimales humanas.

4.7.3 Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

Para el caso de la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, la caracterización de la cinética de crecimiento en el modelo experimental planteado arrojó una curva de crecimiento de las bacterias en medio DMEM/1% LPh y DMEM sin suplemento similar a lo establecido para esta cepa (Figura 17) para las 0, 6 y 24 horas post inoculación (Figura 38). Usando estos dos grupos como control, se evidencia que la presencia de CEM-GW cultivadas con DMEM + 1% LPh inhibió el crecimiento bacteriano de la cepa ATCC 29213 comenzando a las 6 horas de inoculación ($p>0,05$), con una significativa reducción de UFC a las 24 horas ($p<0,01$) posterior a la inoculación.

Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

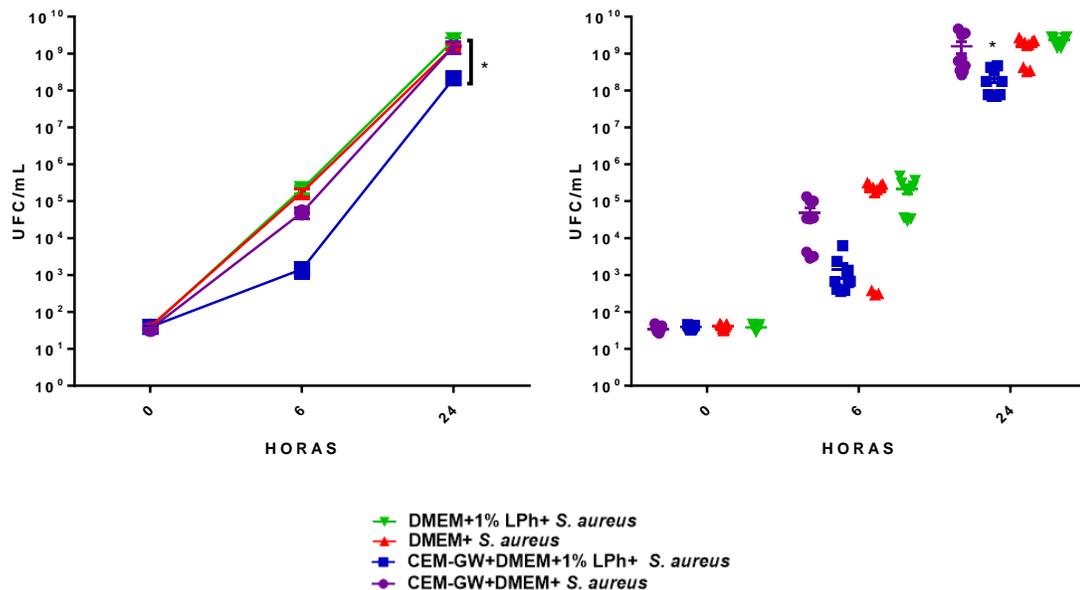


Figura 38: Curvas de crecimiento bacteriano ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh * = CEM-GW+DMEM+1%LPh+S. aureus vs. demás grupos

Los resultados obtenidos se asocian con la observación previa donde las CEM-GW cultivadas con DMEM + 1%LPh e inoculadas con la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 mostraron viabilidad celular, en comparación con las CEM-GW sin suplemento de LPh donde se evidenció acumulación de detritos celulares, indicando un proceso activo de muerte celular asociado a la infección. Previamente Krasnodembskaya y colaboradores demostraron el efecto antimicrobiano de las CEM humanas sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus*, concluyendo que la inoculación con esta cepa en CEM humanas inducen inhibición considerablemente del crecimiento bacteriano *in vitro* [51]. En este trabajo se provee evidencia acumulativa del rol de las CEM de GW humanas en el potencial efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* en un modelo experimental. Este efecto sigue mostrando dependencia de la presencia de Lisado Plaquetario humano en el suplemento de cultivo de las CEM-GW.

4.7.4 Curva de crecimiento bacteriano para cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

Finalmente se evaluó la cinética de crecimiento de la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 en el modelo de infección de CEM-GW. Inicialmente se observó un crecimiento exponencial de la cepa ATCC cultivada en medio DMEM suplementado con 1% de LPh y DMEM sin suplemento a las 0,6 y 24 horas (Figura 39). Sin embargo, a diferencia de las anteriores cepas bacterianas, *Staphylococcus epidermidis* mostró un crecimiento exponencial cuya magnitud fue significativamente inferior a las mostradas para las cepas *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*. Es así como *S. epidermidis* presentó valores de UFC alrededor de 10^3 a las 24 horas, mientras que el promedio observado para las otras tres cepas en esta configuración experimental fue de 10^9 .

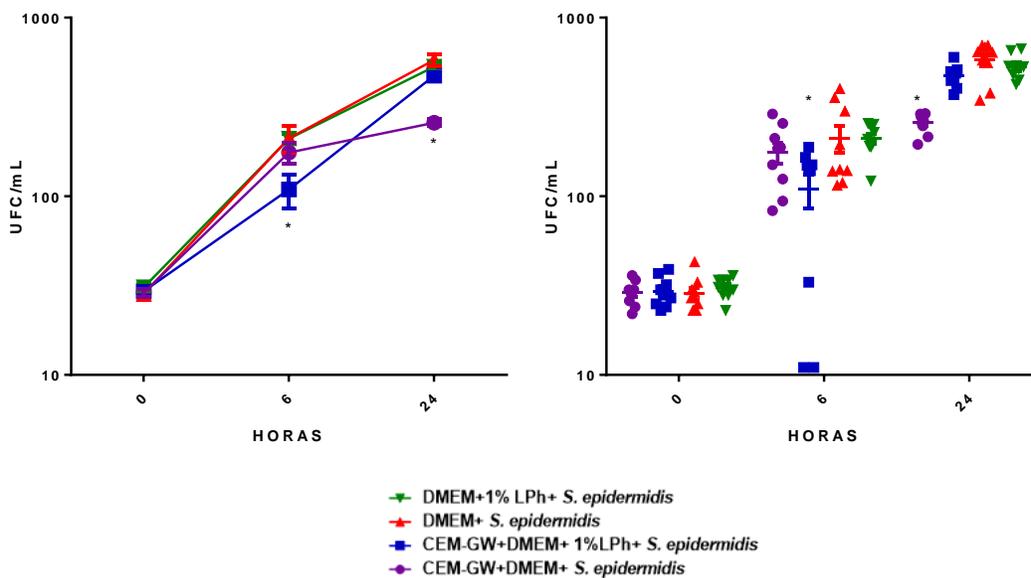


Figura 39: Curvas de crecimiento bacteriano ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 con y sin CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh

A pesar de esta observación, *S. epidermidis* mostró un crecimiento similar a los grupos control (DMEM y DMEM/1% LPh) a las 24 horas en presencia de CEM-GW cultivadas con DMEM + 1% LPh, a pesar que a las 6 horas post-inoculación se observó una inhibición significativa del crecimiento bacteriano ($p < 0,05$ vs. Demás grupos experimentales). Este resultado contrasta con la significativa inhibición del crecimiento bacteriano de la cepa

ATCC 12228 a las 24 horas de incubación en presencia de CEM-GW con DMEM sin suplemento ($p < 0.0001$). Si bien es difícil de explicar la discrepancia obtenida en los resultados experimentales relativos a la cepa *S. epidermidis* para este estudio, es plausible creer que las condiciones de cultivo (DMEM y DMEM/1%) no resultaron favorables para soportar un adecuado crecimiento bacteriano, a diferencia de las otras tres cepas que crecieron con tasas adecuadas. A la luz de esta evidencia, se puede concluir que la interpretación de los resultados relativos al rol de las CEM-GW y la presencia/ausencia de suplemento de LPh se encuentra limitada. Esto se ajusta a lo descrito en el estudio realizado por Georgina Lujan y colaboradores, donde evaluaron la actividad antimicrobiana de 15 compuestos orgánicos sobre la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 describiendo que esta cepa requirió más tiempo para alcanzar la mitad de la fase exponencial, y que su crecimiento está influenciado por factores genéticos y nutricionales del medio en que se desarrolla.

Tomando los resultados observados en esta fase del estudio, se concluye que al menos para tres cepas bacterianas experimentales (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*) existe un potencial efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano asociado a la presencia de CEM-GW. Este efecto inhibitorio es altamente dependiente del uso y presencia de lisado plaquetario humano como suplemento del medio de cultivo. Esto sugiere que el lisado de plaqueta provee señales moleculares que impactan en las CEM-GW ante un estímulo bacteriano, que subsecuentemente induce respuestas moleculares dirigidas a la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de la CEM. Es importante mencionar que en el diseño experimental planteado en el presente estudio se tuvo en cuenta el uso de medio DMEM suplementado con 1% de LPh para descartar un potencial efecto inhibitorio directo del LPh sobre la bacteria. Dado que no se observó en ninguna de las condiciones una diferencia en el crecimiento bacteriano entre DMEM y DMEM/1% LPh, se puede concluir que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano está mediado directamente por una activación de las CEM. Esta activación, que sí depende de la presencia del LPh, engatilla procesos celulares y moleculares que desencadenan otras señales inhibitorias en presencia de una infección bacteriana para su efectivo control.

Entre los mediadores antimicrobianos previamente caracterizados en CEM se encuentran los péptidos antimicrobianos. Por ello, a continuación, se estudió la expresión y secreción

de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1 (hBD-1), Lipocalina-2 (LCN2) y Hepcidina (HAMP) en las CEM-GW sometidas a infección bacteriana con las cepas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. epidermidis*.

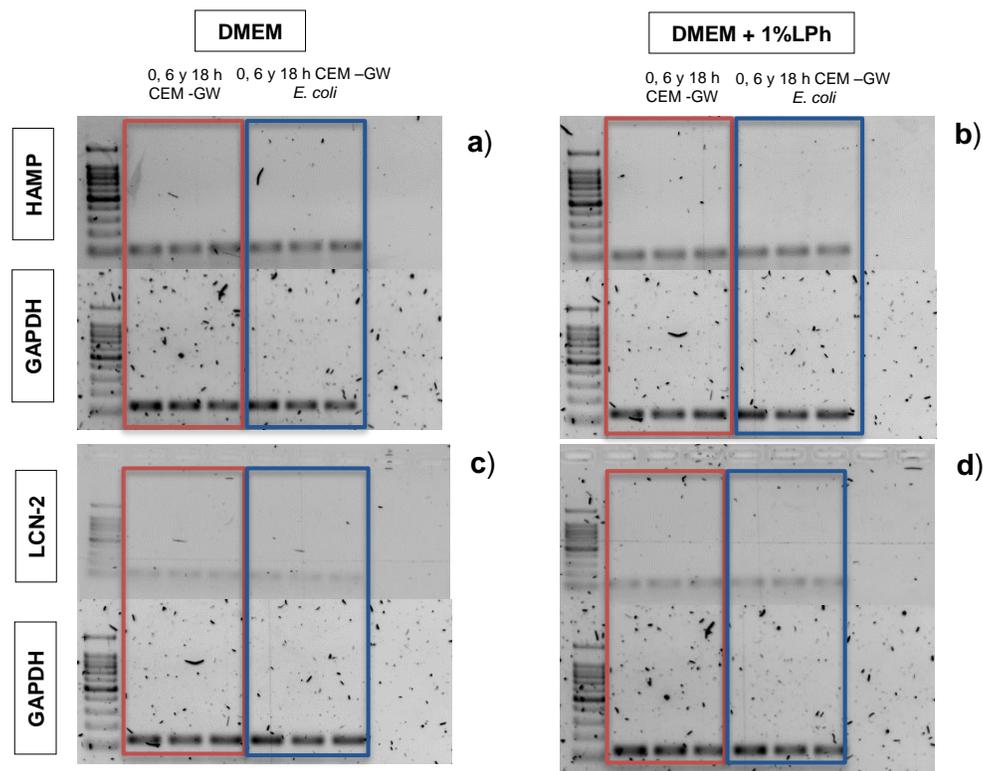
4.8 Evaluación de la expresión de ARN

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se evaluó la expresión de los genes que codifican los péptidos antimicrobianos β -defensina-1 (hBD-1), Lipocalina-2 (LCN2) y Hepcidina (HAMP). Para ello se realizó extracción de ARN total a las 0, 6 y 18 horas de CEM-GW cultivadas con DMEM suplementado con 1% LPh y medio DMEM sin suplemento, así como de CEM-GW cultivadas con DMEM suplementado con 1% LPh y medio DMEM sin suplemento inoculadas con las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228. El ARN total extraído se sometió a retrotranscripción para enriquecer el ARN mensajero y transformarlo a ADNc para su posterior uso en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores (primers) específicos para los genes hBD-1, LCN2 y HAMP. Las PCR realizadas generaron productos amplificados que se resolvieron en geles de agarosa al 2% teñido SYBR Green (Figuras 40,41,42 y 43). Adicionalmente se usaron primers para la amplificación del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual se usó como gen de normalización de la expresión (gen housekeeping), debido a que este gen se expresa de una manera estable y constitutivamente en las CEM-GW [72].

Una vez realizados los geles de agarosa se procedió a realizar la normalización de los datos mediante densitometría a las 0,6 y 24h por medio del software ImageJ. Se utilizó como control gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para la normalización de la expresión. El cambio de la expresión en el tiempo para cada gen se expresó como porcentaje (%) tomando como referencia el nivel de expresión a las 0 horas.

4.8.1 Expresión de ARNm en ATCC *Escherichia coli* 25922

En la figura 40 se observan los productos de PCR en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Green donde se detectan los genes HAMP (99 pares de bases- pb), LCN2 (110 pb), DEFB1 (99 pb) y GAPDH (124 pb) en células expuestas a infección con ATCC *Escherichia coli* 25922. Se puede observar la expresión del gen HAMP, LCN2 y DEFB1 en presencia de DMEM (Figura 40 a, c y e) y DMEM/1% LPh (Figura 40 b, d y f) con la siguiente configuración: los productos de amplificación de los genes HAMP , LCN2 y DEFB1 (parte superior) GAPDH (parte inferior) Carriles: 1, Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, 3 y 4 CEM-GW cultivadas con medio DMEM sin suplemento a las 0,6 y 18 horas respectivamente, carriles 5, 6 y 7 CEM-GW cultivadas en medio DMEM sin suplemento e inoculadas con cepa ATCC *Escherichia coli* 25922 a las 0,6 y 18 horas, carril 8 control negativo (Maxter mix más agua).



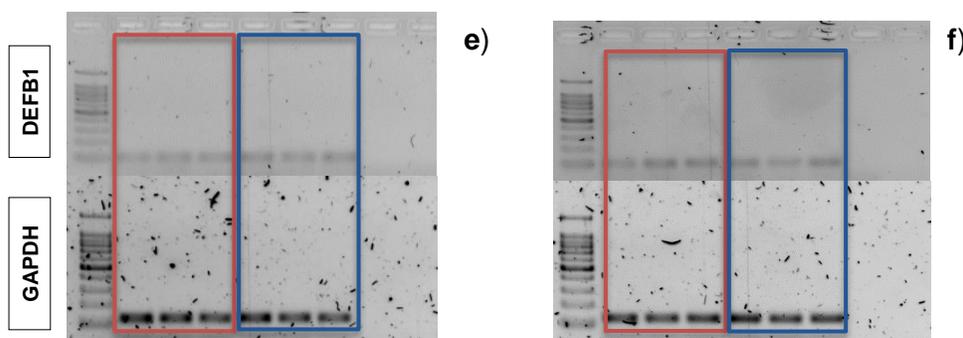


Figura 40: Evaluación de la expresión de ARN de HAMP, LCN2 y DEFB1 por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC *Escherichia coli* 25922

En general se puede observar una expresión homogénea del gen GAPDH en todas las reacciones y a lo largo del tiempo. Esto es importante porque indica que la cantidad inicial de ARN total para el montaje de la reacción de retrotranscripción, así como la subsecuente reacción de PCR fue similar en todas las pruebas analizadas. Teniendo en cuenta esto, se observa también que los péptidos antimicrobianos HAMP, LCN2 y DEFB1 se expresan constitutivamente en las CEM-GW proveniente de los tres donantes, aunque en mayor intensidad para el gen de la Hecpidina, seguido por Lipocalina y β 1-Defensina. Sin embargo, para determinar diferencias en la expresión génica entre los grupos y a diferentes tiempos de infección, se procedió a la cuantificación de la densidad de las bandas del gel por análisis de imágenes con el software ImageJ.

Se obtuvo el porcentaje de expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos HAMP, LCN2 y DEFB1, en la (figura 41) se evidencia que a las 6 horas de incubación las CEM-GW cultivadas con DMEM sin suplemento expresan niveles más bajos de los péptidos antimicrobianos a diferencia de la CEM-GW cultivadas en DMEM suplementado con 1% LPh sin la presencia de *Escherichia coli* ATCC 25922, lo que sugiere un incremento en los niveles de RNA mensajero de estos tres genes cuando el medio esta suplementado con LPh. Solamente cuando las CEM-GW (cultivadas con DMEM sin suplemento y DMEM suplementado con 1%LPh) se encuentran en contacto con *Escherichia coli* ATCC 25922, se evidenció una inducción significativa de la expresión génica del gen HAMP, mientras que para el caso de los genes DEFB1 y LCN-2 que codifican para los péptidos antimicrobianos β -defensina-1 y Lipocalina-2, se observó reducción de la expresión. A las 18 horas los niveles de expresión el ARN mensajero de las AMPs disminuyeron en las CEM-GW. En el caso de las CEM-GW en cocultivo con *Escherichia coli* ATCC 25922

(grupos DMEM sin suplemento) se observó un incremento no significativo en los niveles de expresión de los genes HAMP y DEFB1 que contrastó con lo observado para CEM-GW cultivadas en DMEM suplementado con 1%LPh.

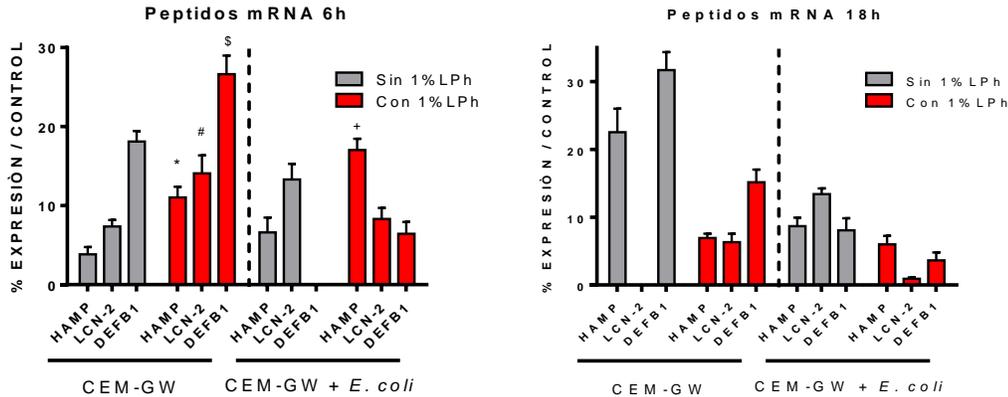
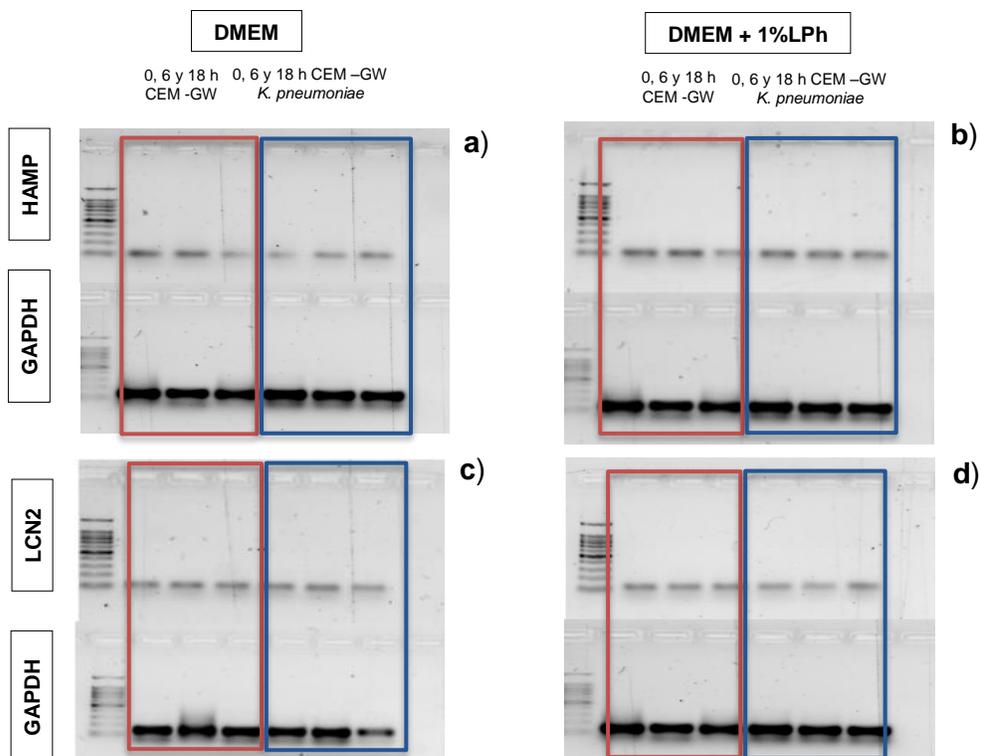


Figura 41: Expresión de ARNm de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + *Escherichia coli* ATCC 25922 con y sin LPh1%. *= $p < 0.001$, HAMP, CEM-GW+1%LPh vs. CEM-GW; #= $p < 0.001$, LCN-2 CEM-GW+1%LPh vs. CEM-GW; \$= $p < 0.001$, DEFB1, CEM-GW+1%LPh vs. CEM-GW; += $p = 0.0058$, HAMP CEM-GW+E. coli vs CEM-GW

A partir de estas observaciones, se puede concluir que las CEM-GW expresan niveles basales de los genes HAMP, LCN-2, DEFB1, lo que se ve reflejado en el porcentaje de expresión cuyo el nivel máximo es a las 6 horas. Es importante anotar que la presencia de 1% de lisado de plaqueta humano como suplemento de DMEM induce significativamente la expresión de los genes que codifican a estos péptidos. Si bien se observa una disminución en la expresión de estos genes cuando las CEM-GW están expuestas a *E. coli* a las 6 horas, es plausible pensar que la activación de la expresión génica se dio más tempranamente (<3 horas), con el fin de incrementar el producto proteico en etapas tempranas de la infección. Esto fue posible corroborarlo cuando se cuantificó el contenido de AMPs secretados por las CEM-GW durante infección (Capítulo 4.9). Sin embargo, el hecho de que exista expresión génica tardía (18 horas) aunque reducida, soporta aún más la evidencia de expresión constitutiva de AMPs por parte de CEM-GW.

4.8.2 Expresión de ARNm en ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

En la figura 42 se observan la expresión génica de las células expuestas o no a infección con *ATCC Klebsiella pneumoniae* 43816. Nuevamente los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa al 2% (tinción con SYBR Green) para los genes HAMP, LCN2, DEFB1 y GAPDH. Se puede observar la expresión de AMPs en presencia de DMEM (Figura 42 a, c y e) y DMEM/1% LPh (Figura 42 b, d y f) con la siguiente configuración: los productos de amplificación de los genes HAMP , LCN2 y DEFB1 (parte superior) GAPDH (parte inferior) Carriles: 1, Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, 3 y 4 CEM-GW cultivadas con medio DMEM sin suplemento a las 0,6 y 18 horas respectivamente, carriles 5, 6 y 7 CEM-GW cultivadas en medio DMEM sin suplemento e inoculadas con cepa *ATCC Klebsiella pneumoniae* 43816 a las 0,6 y 18 horas, carril 8 control negativo (Maxter mix más agua).



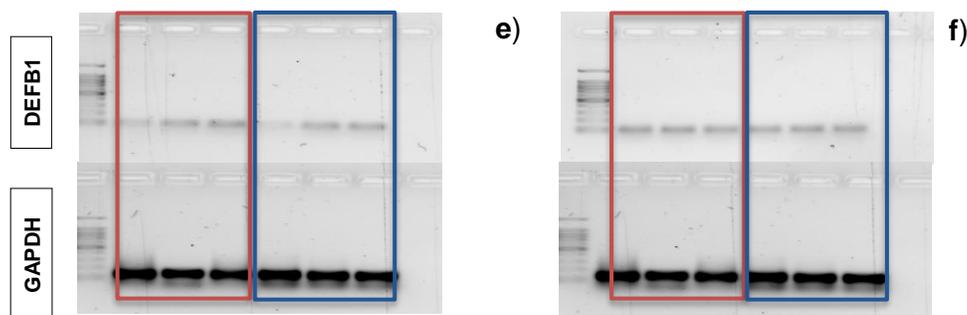


Figura 42: Evaluación de la expresión de ARN de Hepcidina, Lipocalina-2 y β 1-Defensina por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816

En este ensayo se evidenció expresión constitutiva de los diferentes péptidos antimicrobianos en CEM-GW. En presencia de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, se evidenció un incremento significativo del porcentaje de expresión de ARNm de los péptidos antimicrobianos LCN2 y DEFB1 a las 6 horas de incubación (respecto al tiempo 0h) para las CEM-GW cultivadas con DMEM con suplemento al compararse con células sin la presencia de LPh.

Similar a lo observado con *E. coli*, a las 18h los niveles de expresión disminuyeron significativamente, tanto en CEM-GW DMEM sin suplemento como con 1% LPh, independientemente de la exposición a la bacteria ATCC 43816 (Figura 43). Es importante anotar de nuevo que la expresión génica del ARNm de AMPs corresponde a un evento molecular casi que inmediato al estímulo celular, en este caso, la presencia de la bacteria.

En este sentido, es importante mencionar que el tiempo de observación a las 6 horas e incluso a las 18 horas podría ser muy tardío si se pretende evaluar la expresión génica. Como se presentará más adelante, en general se encontró un incremento significativo de productos proteicos de AMPs ya a las 6 horas post-infección, lo que es una clara indicación que el pico de expresión génica sucedió en una etapa temprana de la infección, antes de las 6 horas.

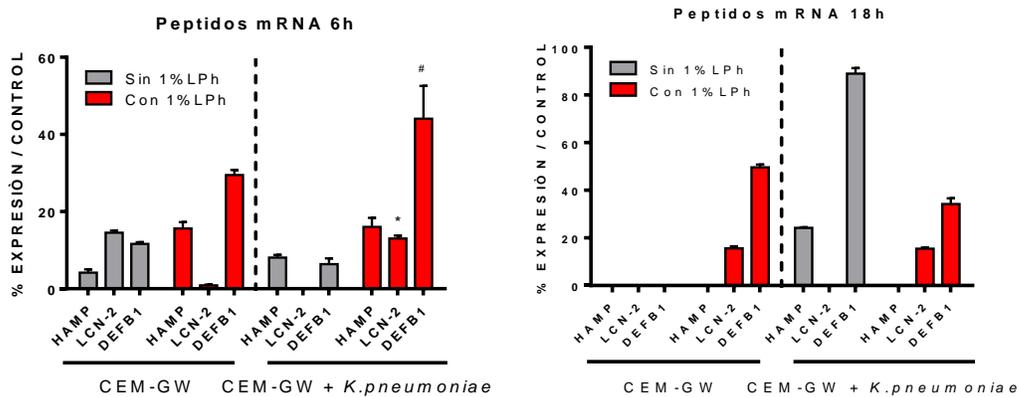


Figura 43: Expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPH1% - CEM-GW + ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 con y sin LPH1%. *= $p < 0.0001$, LCN-2, CEM-GW+*K. pneumoniae* vs. CEM-GW; #= $p = 0.041$, DEFB1, CEM-GW+ *K. pneumoniae* vs. CEM-GW;

4.8.3 Expresión de ARNm ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

Correspondiente con los datos de expresión génica expuestos anteriormente para *E. coli* y *K. pneumoniae*, seguidamente se analizó la expresión de AMPs en CEM-GW expuestas o no a infección con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 (Figura 44). Tal como se indica en la figura se puede observar la expresión del gen HAMP, LCN2 y DEFB1 en presencia de DMEM (Figura 44 a, c y e) y DMEM/1% LPh (Figura 44 b, d y f) con base en la siguiente configuración: los genes HAMP, LCN2 y DEFB1 (parte superior) y GAPDH (parte inferior) dispuestos en los Carriles: 1, Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, 3 y 4 CEM-GW cultivadas con medio DMEM sin suplemento a las 0,6 y 18 horas respectivamente, carriles 5, 6 y 7 CEM-GW cultivadas en medio DMEM sin suplemento e inoculadas con cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 a las 0,6 y 18 horas y carril 8 control negativo.

Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

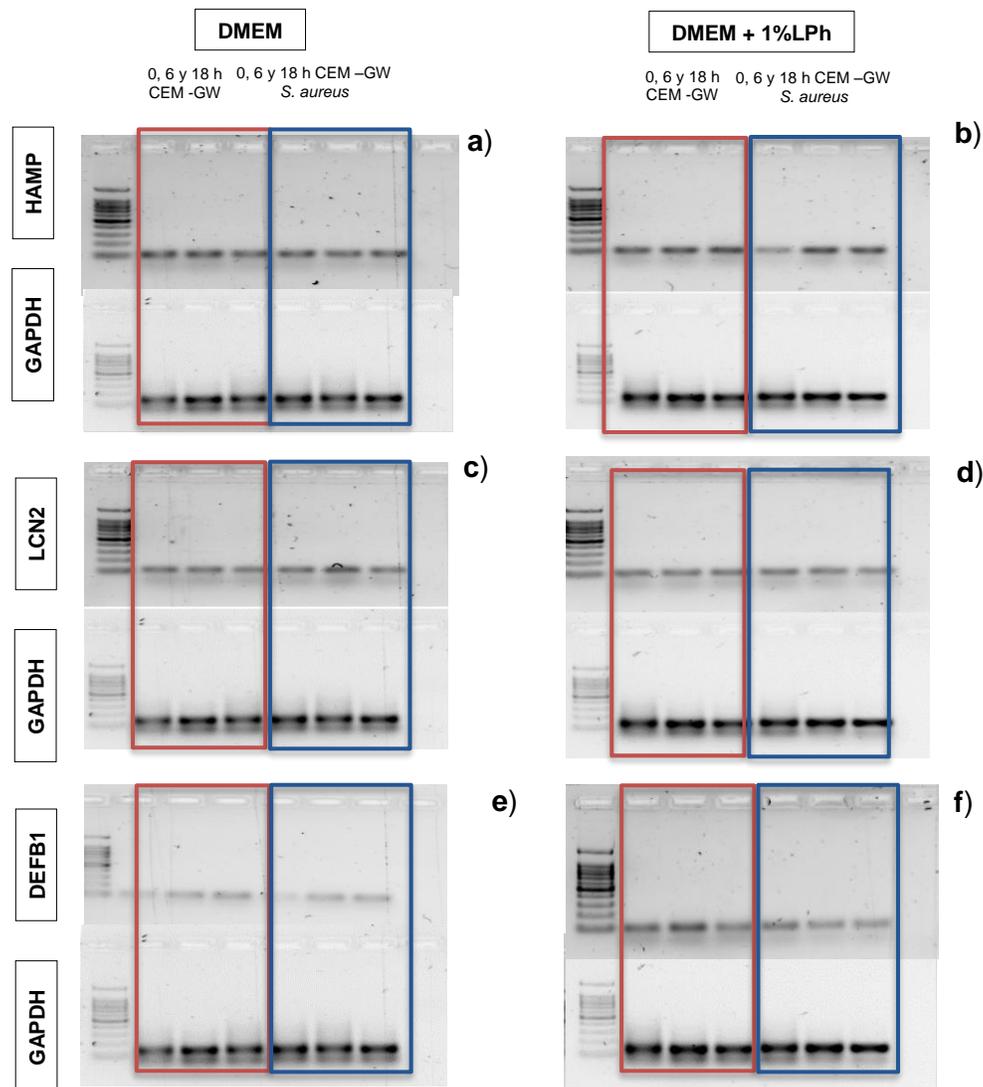


Figura 44: Evaluación de la expresión de ARN de Hecpidina, Lipocalina-2 y β 1-Defensina por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

Para el caso de este set experimental, la expresión AMPs en CEM-GW en presencia o ausencia de infección con *S. aureus*, se puede observar de nuevo expresión constitutiva en los tres genes (HAMP, LCN2 y DEFB1) aunque no hubo incremento del nivel de expresión del ARNm en los tres péptidos con respecto al tiempo 0. En el caso de las CEM-GW cultivadas sin suplemento pero en presencia de infección bacteriana, se observó un aumento significativo de la expresión de HAMP, LCN2 y DEFB1 ($p < 0.0001$, Figura 45).

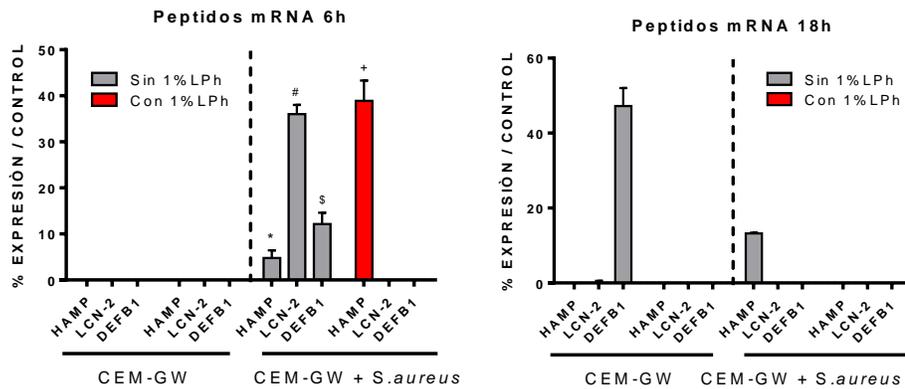
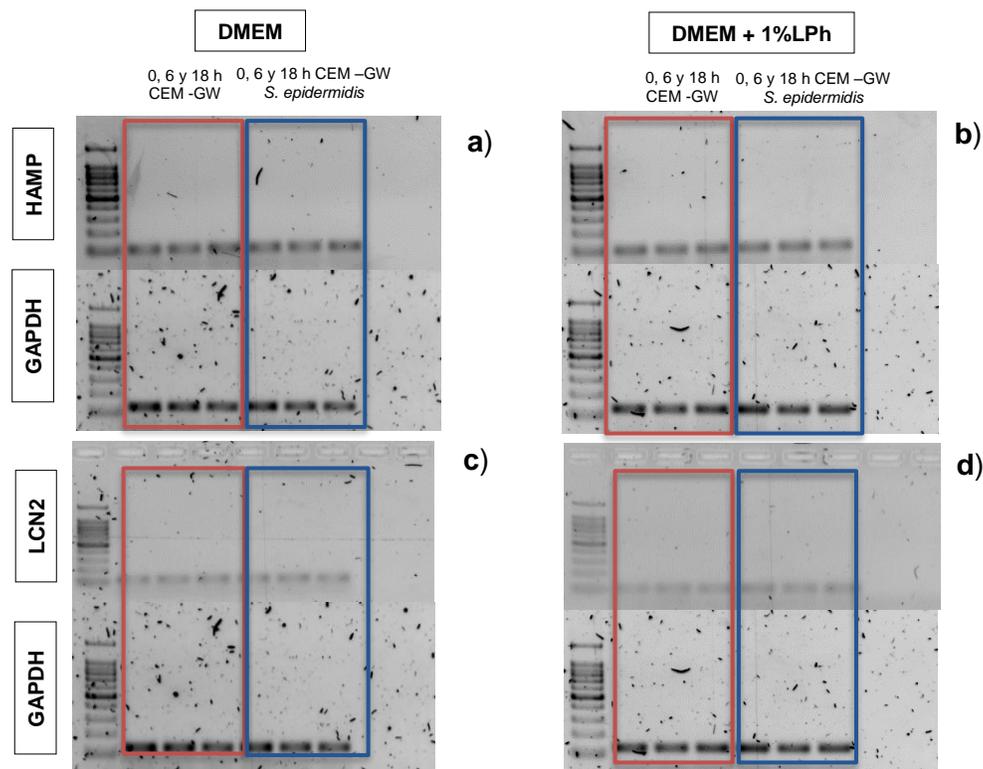


Figura 45: Expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 con y sin LPh1%. %. *= $p < 0.0001$, HAMP, CEM-GW+S. *aureus* vs. CEM-GW; #= $p < 0.002$, LCN-2 CEM-GW+S. *aureus* vs. CEM-GW; \$= $p < 0.001$, DEFB1, CEM-GW+S. *aureus* vs. CEM-GW; + $p < 0.0001$, HAMP, CEM-GW+S. *aureus* vs. CEM-GW

En el caso de las CEM-GW cultivadas en DMEM suplementado con 1%LPh, se observó aumento del porcentaje de expresión de ARNm del péptido antimicrobiano HAMP a las 6 horas de incubación al ser inoculadas con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213. No se observó incremento en la expresión de los genes de los otros dos péptidos analizados. A las 18 horas solo se evidenció el aumento de expresión de un 45% del gen DEFB1 en las CEM-GW crecidas con DMEM sin suplemento y las CEM-GW inoculadas con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 sin medio suplementado aumento la expresión de gen de HAMP. Tomando en cuenta estos resultados se puede evidenciar en general una respuesta de las CEM-GW ante la infección con *S. aureus* en ausencia de suplemento de lisado plaquetario humano y solo se observó inducción de expresión génica en el gen de Hepsidina cuando las células se encontraban suplementadas con LPh. En general esto indica una pobre respuesta de activación de AMPs en CEM-GW expuestas a infección con *S. aureus*. Sin embargo, similar a lo discutido anteriormente, la expresión génica de AMPs en esta condición experimental debe ser evaluada concomitantemente con la secreción del producto proteico de cada péptido antimicrobiano en condiciones de infección.

4.8.4 Expresión de ARNm en ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

Finalmente se evaluó la expresión de ARNm de los genes HAMP, LCN2 y DEFB1 en células expuestas a infección con ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 (Figura 46). Se presenta la expresión de los genes en presencia de DMEM (Figura 46 a, c y e) y DMEM/1% LPh (Figura 46 b, d y f), configurados de manera similar a lo indicado anteriormente: productos de PCR de los genes HAMP, LCN2 y DEFB1 (superior) y GAPDH (inferior) dispuestos en los carriles 1 (Marcador de peso molecular de 100 pb), carriles 2, 3 y 4 (CEM-GW cultivadas con medio DMEM sin suplemento a las 0,6 y 18 horas respectivamente), carriles 5, 6 y 7 (CEM-GW cultivadas en medio DMEM sin suplemento e inoculadas con cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 a las 0,6 y 18 horas) y carril 8 control negativo de la reacción.



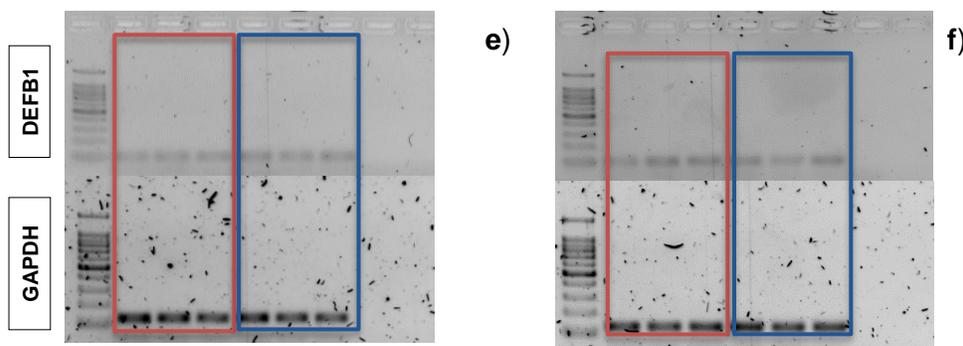


Figura 46: Evaluación de la expresión de ARN de Heparidina, Lipocalina-2 y β 1-Defensina por PCR de CEM-GW inoculadas con ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

La figura 46 muestra expresión constitutiva de los tres péptidos antimicrobianos analizados. A las 6 horas post-infección, las CEM-GW cultivadas con DMEM suplementado con 1%LPh no muestran un incremento del porcentaje de expresión de ARNm de los péptidos antimicrobianos HAMP, LCN2 y DEFB1 con respecto al tiempo 0 (Figura 47). Sin embargo, en presencia de *S. epidermidis* se observa una activación significativa de la expresión génica de todos los AMPs ($p < 0.001$). Adicionalmente, en los grupos experimentales CEM-GW con DMEM sin suplemento y con DMEM/1% LPh, sin infección, solo se encontró aumento en el porcentaje de expresión para los genes de HAMP y DEFB1 a las 6 horas, sin embargo esta diferencia en expresión ni fue significativa con respecto a CEM-GW en presencia de la bacteria *S. epidermidis*. Seguidas 18 horas de infección con la bacteria, no se encontró expresión de ARN de los diferentes péptidos antimicrobianos en CEM-GW cultivadas tanto en DMEM sin suplemento de 1%LPh como con suplemento en presencia o ausencia de *S. epidermidis*. Únicamente se observó inducción de la expresión HAMP en CEM-GW infectadas, mientras que se encontró un pico de expresión de DEFB1 en CEM-GW no infectadas.

Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

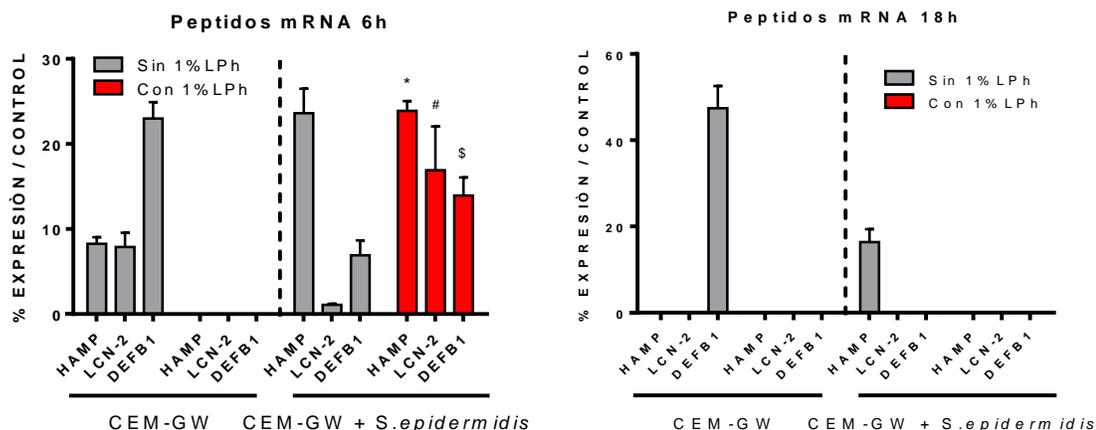


Figura 47: Expresión de ARN de los péptidos antimicrobianos (HAMP, LCN-2, DEFB1 y GAPDH) a las 6h y 18h en CEM-GW con y sin LPh1% - CEM-GW + ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 con y sin LPh1%. *= $p < 0.001$, HAMP, CEM-GW+S. *epidermidis* vs. CEM-GW; #= $p < 0.001$, LCN-2 CEM-GW+S. *epidermidis* vs. CEM-GW; \$= $p < 0.001$, DEFB1, CEM-GW+S. *epidermidis* vs. CEM-GW

En ese sentido, si bien la expresión génica de AMPs es constitutiva en las CEM-GW en condiciones basales, la infección con *S. epidermidis* fue capaz de inducir una importante activación de la expresión de LCN2 y DEFB1 en presencia de lisado plaquetario humano. Sin embargo, como se ha observado previamente, a las 18 horas post infección la expresión diferencial de AMPs fue casi nula y no dependió de la presencia de infección bacteriana y/o suplemento de LPh.

Tomando en cuenta los datos obtenidos en los análisis de expresión génica de los tres genes que codifican para los péptidos antimicrobianos β -defensina-1 (hBD-1), Lipocalina-2 (LCN2) y Hecpidina (HAMP), se puede concluir que las CEM-GW expresan de manera constitutiva el ARN mensajero de los tres genes. Se evidenció en general activación de la expresión génica de estos tres genes bajo dos circunstancias: 1. Presencia de LPh humano en el suplemento de cultivo de CEM-GW y 2. Infección bacteriana con las cepas ATCC empleadas en la presente investigación. Es así como se evidenció que la expresión de AMPs aumenta considerablemente antes de las 6 horas de incubación de las CEM-GW cultivadas con DMEM suplementado con 1%LPh y en cocultivo con las diferentes cepas ATCC utilizadas en los experimentos. Sin embargo dados los resultados de estos análisis es posible pensar que ante una infección bacteriana, las CEM-GW activan la expresión génica mucho antes de las 6 horas de exposición bacteriana (1-3 horas) lo que permitiría tener disponible producto proteico funcional en estadios de infección temprana.

A las 18 horas sin embargo, el impacto de la expresión de ARN mensajero de los péptidos antimicrobianos no muestra ninguna asociación con el estatus de infección o la presencia de suplemento de medio de cultivo, lo que refuerza la hipótesis que la inducción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW es un evento muy temprano en la infección experimental bacteriana implementada en este estudio.

A continuación se analizó la presencia de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1 (hBD-1), Lipocalina-2 (LCN2) y Hecpidina (HAMP) en sobrenadantes de CEM-GW expuestas a infección experimental con cepas bacteriana. ATCC.

4.9 Expresión péptidos antimicrobianos ELISA

Posterior al análisis de la expresión RNA mensajero de β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hecpidina se realizó cuantificación del contenido de péptidos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes celulares a partir de ELISA. Teniendo en cuenta los análisis de expresión realizados, se conoció por primera vez la expresión constitutiva generalizada de AMPs en CEM-GW. Sin embargo. Debido a la alta variabilidad y poca consistencia de la expresión génica observada en las distintas condiciones experimentales ejecutadas en el presente estudio, la cuantificación de la secreción acumulada de AMPs en condiciones basales y de infección con *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. epidermidis* fue crítica para determinar el rol de las CEM-GW en la inhibición del crecimiento bacteriano bajo condiciones de infección experimental.

Para la determinación de la concentración de AMPs, se colectaron y almacenaron sobrenadantes de CEM-GW (tres donantes) cultivadas en DMEM sin suplemento y suplementado con 1% LPh, en condiciones basales o en cocultivo con las cepas bacterianas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228. Se recuperaron sobrenadantes a las 6 y 18 horas post inoculación bacteriana y se determinó la concentración acumulada de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hecpidina por ELISA (Figuras 48 a 51).

4.9.1 Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC *Escherichia coli* 29213

Consistente con lo observado para la expresión génica de AMPs, las CEM-GW son capaces de secretar de manera acumulada AMPs en condiciones basales (Figura 48). Sin embargo, llama la atención que una vez las células están en cultivo en presencia de LPh, la acumulación de AMPs en el sobrenadante se incrementa de manera significativa en CEM-GW a las 6 horas para los AMPs Hecpidina y Lipocalina-2. Es importante mencionar que esta observación es consistente con lo obtenido en relación con la expresión génica y sugiere que a las 6 horas de cultivos ya existe una significativa acumulación de péptidos, lo que implica que el pico de expresión génica ocurre probablemente en estadios tempranos del cultivo.

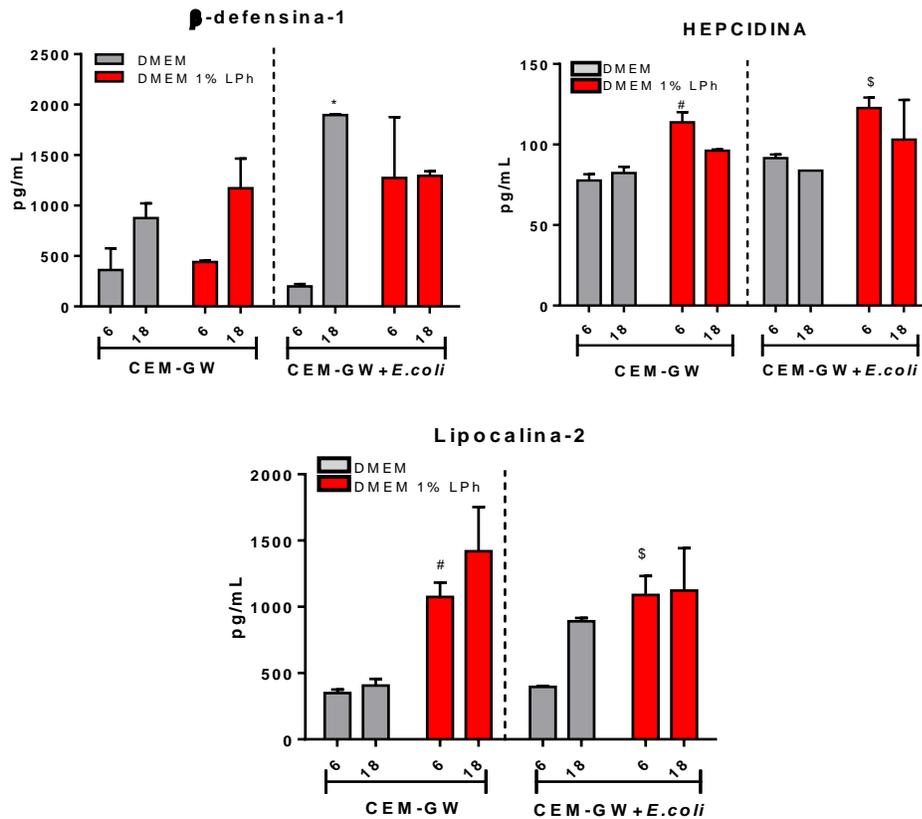


Figura 48: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC *Escherichia coli* 29213 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina 1, Hecpidina, y Lipocalina 2. * $p=0.04$, β -defensina-1 (18H) CEM-GW+*E. coli* vs. CEM-GW; # $p=0.038$ Hecpidina (6H), CEM-GW+1%LPh vs CEM-GW; § $p=0.046$ Hecpidina (6H), CEM-GW+*E.coli*+1%LPh vs CEM-GW+*E. coli*; # $p=0.04$ Lipocalina-2 (6H), CEM-GW+1%LPh vs CEM-GW; § $p=0.02$ Lipocalina-2 (6H), CEM-GW+*E.coli*+1%LPh vs CEM-GW+*E. coli*

Remarcablemente, cuando las CEM-GW se encuentran expuestas a ATCC *Escherichia coli* 29213, incrementan significativamente la expresión de AMPs, especialmente Hecpidina y Lipocalina-2, cuando están en cultivo con LPh ($p=0.046$ y $p=0.02$, respectivamente). Esto indica que el LPh confiere a las CEM-GW propiedades protectoras adicionales que controlan la infección bacteriana. Es así como se observa que los niveles de expresión proteica se ven aumentados en el caso de la β -defensina-1 a las 6 y 18 horas en las CEM-GW crecidas con medio DMEM con LPh y en cocultivo con la cepa ATCC *Escherichia coli* 29213, comparadas con CEM-GW inoculadas y cultivadas sin LPh. De manera similar, en el caso de la hepcidina se observa que los niveles proteicos se mantienen similares tanto a las 6 como las 18 horas en las CEM-GW crecidas con DMEM sin suplemento, en contraste con las células cultivadas en suplementado con 1%LPh, en donde se observa incremento de la concentración del péptido ($p=0.038$). Finalmente, para el caso de Lipocalina -2, se evidencia un aumento significativo de la secreción peptídica en las CEM-GW crecidas con DMEM suplementado con 1%LPh ($p=0.04$). Considerando la importante inhibición del crecimiento de *E. coli* en presencia de CEM-GW, podemos atribuir este efecto antimicrobiano en la cepa ATCC *Escherichia coli* 29213 (Figura 36) a la secreción de Hecpidina, Defensina y Lipocalina-2, las cuales se incrementaron cuando las CEM-GE estaban expuestas a LPh.

4.9.2 Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC *Klebsiella pneumoniae*

Para el caso de la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816, se determinaron los niveles de expresión proteica a las 6 y 18 horas de incubación de CEM-GW expuestas a infección por este microorganismo. Similar a *E. coli*, se observa un incremento en la secreción de los tres AMPs analizados cuando las células estaban en presencia de LPh (Figura 49). De manera importante, se observa un significativo aumento en la concentración del péptido Lipocalina-2 en presencia de DMEM/1% LPh que es superior al observado para β 1-

Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

defensina y Hepsidina ($p=0.22$). Sin embargo, para estos últimos dos péptidos se observó un incremento en la producción por parte de CEM-GW cultivadas en presencia de LPh.

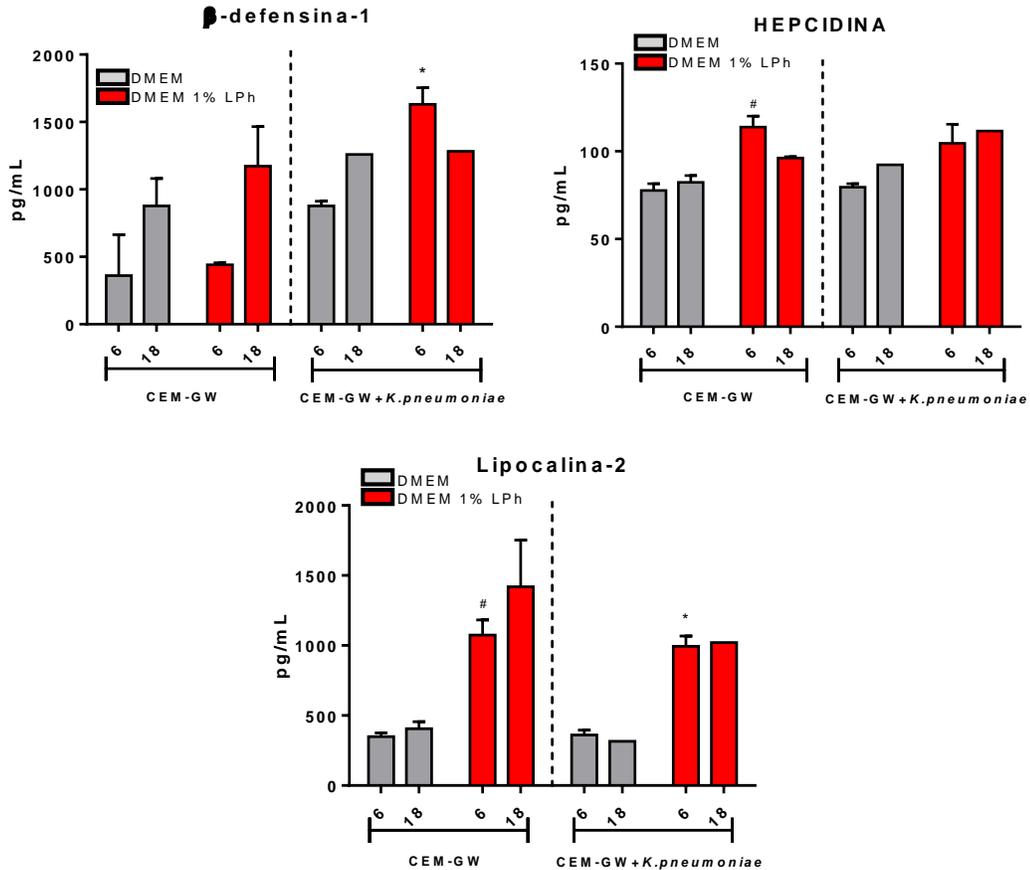


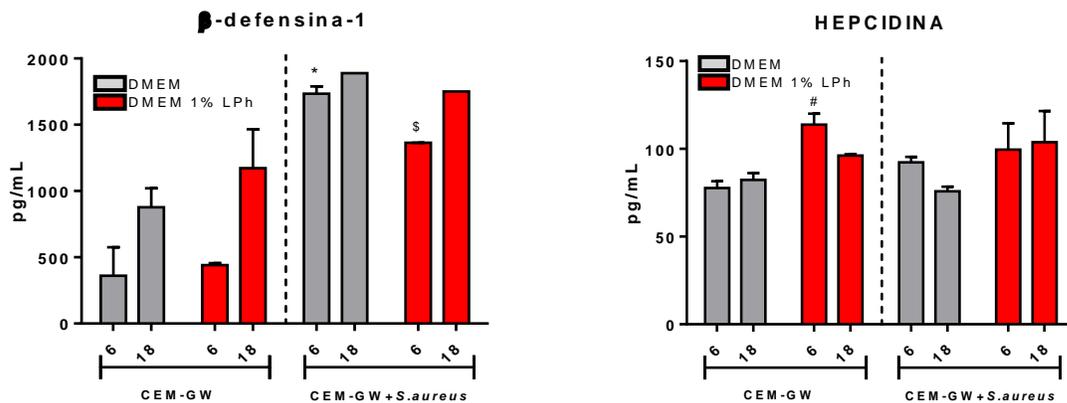
Figura 49: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β-defensina 1, Hepsidina, y Lipocalina 2 * $p=0.0274$ β-defensina-1 (6H), CEM-GW+*K.pneumoniae*+1%LPh vs CEM-GW+ *K.pneumoniae*; # $p=0.038$ Hepsidina (6H), CEM-GW+1%LPh vs CEM-GW; # $p=0.022$ Lipocalina-2 (6H), CEM-GW+1%LPh vs CEM-GW; * $p=0.016$ Lipocalina (6H), CEM-GW+ *K.pneumoniae* +1%LPh vs CEM-GW+ *K.pneumoniae*

En el caso de las CEM-GW sometidas a infección con *K.pneumoniae*, se observa un claro y significativo incremento de los péptidos antimicrobianos β-defensina-1, Lipocalina-2 en medio DMEM suplementado con 1%LPh, cuando se compara con CEM-GW cultivadas en DMEM solo ($p=0.0274$ y $p=0.016$ respectivamente). Finalmente es posible atribuir la inhibición del crecimiento de la cepa ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 (Figura 37), a la

significativa presencia de péptidos antimicrobianos cuando las CEM-GW están expuestas a 1% LPh.

4.9.3 Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC *Staphylococcus aureus* 29213

A diferencia de lo observado en la infección experimental de CEM-GW por *E. coli* y *K. pneumoniae*, para el caso de la infección con la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, se encontraron marcadas diferencias en la expresión proteica de los péptidos antimicrobianos β -defensina-1, Lipocalina-2 y Hepsidina detectada en sobrenadantes de CEM-GW (Figura 50). Si bien en el caso de la β -defensina-1 hay un incremento significativo cuando las CEM-GW están en cocultivo con DMEM/1% LPh, con respecto a CEM-GW cultivadas en DMEM no se observan diferencias de concentración entre DMEM y DMEM/1% LPh cuando las células están expuestas a la bacteria ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 e incluso se observa una leve disminución de la concentración del péptido.



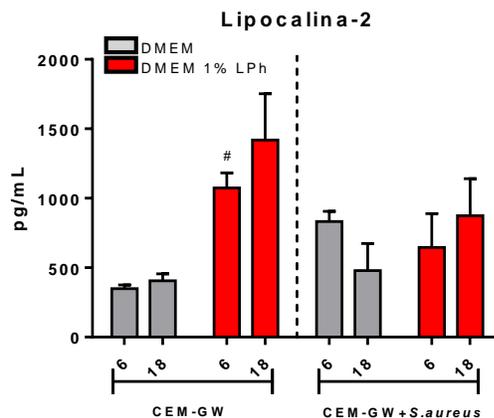


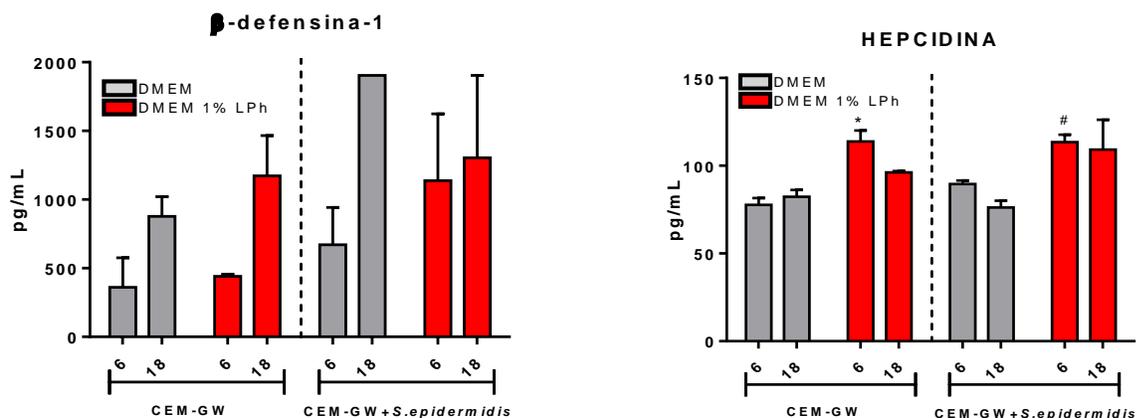
Figura 50: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina 1, Hecidina, y Lipocalina 2. * $p=0.025$ β -defensina 1 (6H) CEM-GW+ *S.aureus* vs. CEM-GW; $\$$ $p=0.003$ β -defensina 1 (6H) CEM-GW+*S.aureus*+1% LPh vs. CEM-GW+1% LPh; # $p=0.038$ Hecidina (6H) CEM-GW+1% LPh vs. CEM-GW; # $p=0.026$ Lipocalina-2 (6H) CEM-GW+1% LPh vs. CEM-GW

Para el caso de β 1-defensina, independientemente que estén acompañadas con medio DMEM sin suplemento o suplementado con 1%LPh, se evidencia un leve incremento a las 6 horas de las concentraciones peptídicas en las CEM-GW que están en cocultivo la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213 ($p=0.003$). Este ligero aumento de la concentración de β 1-defensina podría eventualmente explicar la inhibición del crecimiento observada para *Staphylococcus aureus* en el presente estudio (Figura 38). El hecho de que no se observó una dramática inhibición del crecimiento bacteriano podría estar asociado al bajo incremento de los niveles de AMPs aquí observados. Para el caso de Lipocalina-2 y Hecidina, si bien se observaron diferencias significativas en el contenido proteico en sobrenadantes de CEM-GW cultivados en presencia de 1% de LPh ($p= 0.026$ y 0.038 respectivamente), en presencia de *Staphylococcus aureus* no se observó inducción significativa de la secreción de estos péptidos en el sobrenadante. En general, la pobre secreción de péptidos antimicrobianos durante la infección podría explicar la baja respuesta de las CEM-GW para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* de manera significativa.

4.9.4 Secreción de péptidos antimicrobianos por CEM-GW en infección con ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228

Finalmente, en la figura 51 se presentan los niveles de expresión proteica de los péptidos antimicrobianos cuando las CEM-GW que están expuestas a la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228. En general se puede evidenciar una alta variabilidad en la secreción de AMPs en los distintos grupos experimentales, en presencia o no de la bacteria. En el caso del péptido antimicrobiano β -defensina-1, no se observa un patrón de respuesta que permita inferir un incremento estadísticamente significativo de la concentración peptídica asociada a la presencia o no de *S. epidermidis*.

Para el caso de la hepcidina se observa concentraciones mayores en CEM-GW cultivadas en medio DMEM suplementado con 1%LPh ($p=0.038$ vs. Sin suplemento de 1%LPh) que sugiere una asociación entre el incremento de AMP en el sobrenadante y la presencia positiva de suplemento basado en lisado plaquetario. Igualmente se observó un aumento significativo de la expresión de Hecpidina en sobrenadantes de CEM-GW expuestos a infección con la cepa ATCC 12228 cuando se encontraban en cultivo suplementado con LPh ($p=0.035$. vs sin suplemento de LPh en el medio).



Evaluación In vitro de la actividad antimicrobiana de las Células Estromales Mesenquimales de Gelatina de Wharton (CEM-GW)

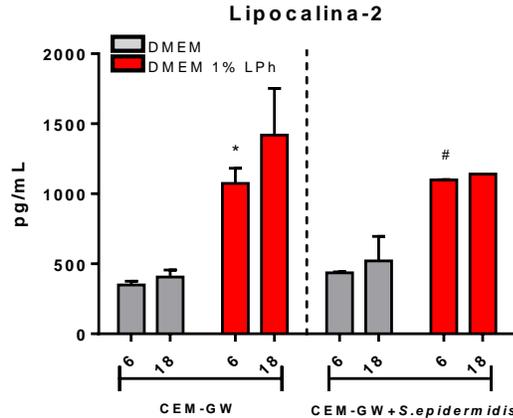


Figura 51: Niveles de expresión proteica (ELISA) a las 6h y 18 h en CEM-GW cultivadas en DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh - CEM-GW + ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 con DMEM y DMEM suplementado con 1%LPh de los péptidos antimicrobianos β -defensina 1, Hecpidina, y Lipocalina 2. * $p=0.038$ Hecpidina (6H) CEM-GW+1% LPh vs. CEM-GW; # $p=0.035$ Hecpidina (6H) CEM-GW+S.*epidermidis*+1% LPh vs. CEM-GW+ *S. epidermidis*; * $p=0.02$ Lipocalina-2 (6H) CEM-GW+1% LPh vs. CEM-GW; # $p=0.001$ Lipocalina-2 (6H) CEM-GW+ *S. epidermidis* +1% LPh vs. CEM-GW+ *S. epidermidis*.

Hay que anotar que se pudo observar un efecto mucho más significativo en la concentración de Lipocalina-2 observada en CEM-GW cultivadas en medio DMEM con suplemento de LPh, especialmente durante la fase de infección experimental con *S. epidermidis* ($p=0.001$). Esto podría explicar en este caso, el efecto inhibitorio de baja magnitud observado para las CEM-GW sobre la cepa ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 (Figura 39), el cual se intensificó cuando el medio de cultivo fue suplementado con lisado plaquetario humano.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio sugieren un claro rol de la producción y secreción de péptidos antimicrobianos en el control e inhibición del crecimiento bacteriano por parte de las células estromales mesenquimales de la gelatina Wharton del cordón umbilical. Según lo descrito por Alcayaga y colaboradores [50], la mayoría de los datos sobre las propiedades antimicrobianas de las CEM se han obtenido de estudios *in vitro* con cepas bacterianas en diseños experimentales similares, concluyendo que ante un estímulo de infección bacteriana las CEM producen péptidos antimicrobianos que disminuyen significativamente el crecimiento microbiano. En el presente estudio se estandarizó y caracterizó un modelo *in vitro* de infección de CEM de GW del cordón umbilical humano con cuatro tipos bacterianos representativos que permitió la identificación de un significativo efecto antimicrobiano por parte de CEM-GW. El efecto inhibitorio caracterizado se asoció a la expresión y secreción de péptidos antimicrobianos, en línea con la evidencia previamente aportada por estudios similares. De manera relevante, este estudio presenta por primera vez evidencia de la eficacia antimicrobiana mediada por péptidos antimicrobianos específicamente en CEM-GW de cordón umbilical humano.

Como se puede observar en la Tabla 3, se presenta un análisis global de la respuesta de las CEM-GW ante la infección bacteriana en términos de viabilidad y muerte celular, expresión y producción/liberación de péptidos antimicrobianos y su asociación con la magnitud de la inhibición del crecimiento bacteriano. En presencia de las diferentes cepas ATCC evaluadas a lo largo de este estudio, se evidencia que la mayor muerte celular de CEM-GW se presentó en el cocultivo con la cepa ATCC *Escherichia coli* 25922, seguido

por la *Klebsiella pneumoniae* 43816, el *Staphylococcus aureus* 29213 y por último por el *Staphylococcus epidermidis* 12228. Esta observación sugiere que la infección experimental de CEM-GW con las cepas ATTC *Escherichia coli* 25922 y *Klebsiella pneumoniae* 43816 induce un impacto patológico mayor. Esto a su vez conduciría a mayores niveles de estrés celular inducido sobre la CEM que posteriormente podría engatillar mecanismos compensatorios significativos que estarían incrementando el efecto antimicrobiano y de disponibilidad de péptidos encontrados. En efecto, estas dos cepas bacterianas presentaron los mayores niveles de inhibición bacteriana en cocultivo y se asociaron con incrementos significativos en la expresión y producción de péptidos antimicrobianos.

Cepa ATCC	Muerte CEM-GW (en 1%LPh)	Inhibición UFC	% Expresión RNAm						Producción del péptido					
			HAMP		LCN-2		DEFB1		HAMP		LCN-2		DEFB1	
			-L	+L	-L	+L	-L	+L	-L	+L	-L	+L	-L	+L
<i>E. coli</i> 25922	xxx	xxx	xx	xxx	xx	xxx	xx	xxx	xx	xxx	xx	xxx	xx	xxx
<i>K.pneumoniae</i> 43816	xx	xxx	xx	xx	xx	xxx	xx	xxx	xx	xx	xx	xxx	xx	xxx
<i>S. aureus</i> 29213	xx	xxx	x	xxx	x	x	x	x	x	x	x	xxx	x	xxx
<i>S. epidermidis</i> 12228	x	x	xx	xx	xx	xxx	xx	xxx	x	xxx	x	xxx	x	x

Tabla 3: Resumen características expresadas por las CEM-GW en cocultivo con cepas ATCC. **x** bajo, **xx** moderado y **xxx** alto, **-L:** CEM-GW + DMEM + ATCC, **+L:** CEM-GW + DMEM/1%LPh + ATCC

Por otro lado, basados en los resultados de este estudio, se pudo confirmar que el medio de cultivo DMEM suplementado con LPh (1%) soporta el crecimiento y viabilidad de las CEM-GW. Sin embargo, observando los niveles de inhibición del crecimiento bacteriano en las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, se puede concluir que el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano se asoció íntimamente con la presencia del LPh como suplemento del medio de cultivo (Tabla 3). Esta observación sugiere que el lisado plaquetario proporciona señales moleculares a las CEM-GW infectadas con un inóculo bacteriano, induciendo la activación de vías de señalización que resulta en la activación y secreción de moléculas el crecimiento de las cepas ATCC como los péptidos antimicrobianos. Si bien el efecto sinérgico del LPh en la inhibición del crecimiento bacteriano inducido por CEM-GW no había sido descrito previamente, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares ligados a la

activación de las CEM-GW por el LPh para inducir la expresión y liberación de péptidos antimicrobianos por parte de estas células.

Para el caso de los péptidos antimicrobianos caracterizados en CEM-GW en este estudio, se observa una expresión constitutiva en los diferentes donantes analizados (% Expresión RNAm, Tabla 3). Esta evidencia apunta a que los AMPs podrían ser un mecanismo congénito que media el efecto antimicrobiano en CEM en general y en este caso en mesenquimales de la GW del cordón umbilical. Es importante sin embargo mencionar, que el efecto inhibitorio observado requirió un incremento significativo tanto de los niveles de ARNm como de proteína secretada por la célula, lo que a su vez dependió tanto del nivel de citotoxicidad inducida por el inóculo bacteriano, así como de la presencia de LPh en el medio de cultivo. Entonces, el efecto antimicrobiano encontrado no se puede atribuir exclusivamente a una respuesta intrínseca celular, sino que es altamente dependiente de la magnitud de la infección activa, así como de la estimulación constante con lisado plaquetario humano, como fuente de factores de crecimiento y sobrevida para la adecuada funcionalidad celular. Becherucci y colaboradores ya habían descrito el importante rol del lisado plaquetario humano como fuente de moléculas bioactivas y factores de crecimiento que le permite a las CEM desarrollarse de manera óptima y responder ante las diferentes señales que se puedan presentar en el medio que crecen [73]. En este estudio se ha expandido esa función más allá del soporte del crecimiento celular, proveyendo evidencia sobre el rol fundamental del LPh en la protección celular ante una infección bacteriana en CEM-GW.

Por último, analizando en detalle la producción y secreción de AMPs por CEM-GW en condiciones de infección experimental, se observa que para el caso de la Hepsidina se encontró una aparente inducción de expresión proteica en la infección con la bacteria ATCC *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 pero en menor proporción en ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 y *Staphylococcus aureus*. Es posible atribuir la inhibición del crecimiento de las cepas *Escherichia coli* y el *Staphylococcus epidermidis* a la significativa presencia de este péptido antimicrobiano lo que concuerda con estudios previos de Alcayaga y colaboradores [50], donde destacan que la hepcidina actúa como una hormona reguladora del hierro y ejerce un amplio espectro de actividad

antimicrobiana contra especies bacterianas clínicamente relevantes como *Escherichia coli* y el *S. epidermidis*.

Similarmente, se observó una expresión diferencial del péptido β -defensina 1 asociada a cada cepa empleada en el modelo de infección bacteriana. Es así como los niveles de este péptido se vieron incrementados cuando las CEM-GW cultivadas con DMEM suplementado con LPh se infectaron con ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 y *Staphylococcus aureus* 29213 pero en menor proporción en inóculos de ATCC *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus epidermidis* 12228. Tanto en el caso de Hecpidina como β -defensina 1, la inducción de la secreción peptídica dependió de la cepa bacteriana inoculada, lo que sugiere potenciales mecanismos moleculares implicados en la activación de cada péptido. Se ha descrito un importante rol de los receptores Toll Like (TLR) en el reconocimiento de patrones específicos bacterianos y la subsecuente inducción de AMPs en células humanas. Es entonces plausible pensar que la existencia de patrones específicos asociados a cada una de las cepas bacterianas utilizadas determina la activación de distintos receptores TLR, lo que a su vez induce la expresión diferencial de péptidos a nivel celular. En ese sentido *Escherichia coli* y el *Staphylococcus epidermidis* podrían estimular un TLR distinto al estimulado por ATCC *Klebsiella pneumoniae* 43816 y *Staphylococcus aureus* 29213, induciendo patrones de secreción peptídica de Hecpidina y β -defensina 1 por parte de CEM-GW infectadas. Caso contrario se observó con el péptido Lipocalina-2, donde se encontró un incremento significativo de la concentración en CEM-GW durante la infección con las cuatro cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228. La expresión de Lipocalina-2 podría considerarse entonces como un péptido antimicrobiano de secreción no dependiente de patrones bacterianos específicos en CEM-GW lo que sugeriría un patrón promiscuo de reconocimiento bacteriano por parte de distintos TLR en CEM-GW.

Es importante resaltar que este es el primer estudio a la fecha que aborda el rol de las CEM-GW en la inhibición de la infección bacteriana de 4 cepas ATCC de diversas características y apunta a los péptidos antimicrobianos como su principal mecanismo de inhibición. En resumen, los datos que aquí se presentan proveen la evidencia del efecto

antimicrobiano de las CEM-GW sobre las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228. Este efecto es dependiente de la presencia de 1% de LPh el cual induce la expresión de los genes de HAMP, LCN-2 Y DEFB1 de manera temprana estimulando la acumulación de las respectivas proteínas (Hepcidina, Lipocalina-2 y β 1-defensina) con la subsiguiente inhibición del crecimiento bacteriano in vitro. Así mismo, los resultados sugieren que en presencia de las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 43816, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Staphylococcus epidermidis* 12228 las CEM-GW activan la expresión de péptidos antimicrobianos como mecanismo de defensa a la infección, que es altamente efectivo únicamente en presencia de lisado plaquetario humano, lo que sugiere un efecto sinérgico entre este y las CEM-GW. Las CEM-GW surgen como alternativa para reducir la carga de patógenos potenciales para los humanos que son trasplantados con estas células, debido a que producen péptidos antimicrobianos que se pueden constituir en moléculas promisorias para ser incluidas en el recambio de los fármacos antimicrobianos actualmente empleados. En el contexto del desarrollo de estrategias de terapia celular para medicina regenerativa basada en el empleo de CEM de GW del cordón umbilical, la propiedad antimicrobiana identificada y caracterizada en el presente estudio introduce un efecto aditivo potencialmente útil para incrementar la viabilidad del producto celular e introducir un efecto de control o mitigación de potenciales infecciones bacterianas asociadas con la aplicación de terapias celulares en humanos.

5.2 Recomendaciones

Es importante mencionar que el tiempo de observación a las 6 horas e incluso a las 18 horas en los experimentos es muy tardío si se pretende evaluar la expresión génica y la secreción de péptidos antimicrobianos temprana. Por tal motivo para estudios posteriores se recomienda realizar muestreos entre la primera hora y las 3 horas posteriores al cocultivo de CEM-GW con cepas bacterianas.

Para dar continuidad a este trabajo, se puede estudiar los mecanismos de activación de las CEM-GW ante una infección por patógenos. Uno de estos mecanismos está relacionado con el papel que juegan los receptores tipo Toll específicamente TLR2 y TLR4 presentes en la membrana de las CEM-GW en la señalización para que estas desencadenen una respuesta en la inhibición del crecimiento bacteriano. Además, si bien este estudio permitió evidenciar que las CEM-GW ejercen fuertes efectos antibacterianos a través de mecanismos directos, es importante explorar la función antimicrobiana de las CEM en condiciones más fisiológicas, como es el caso del ambiente pro-inflamatorio propio de una infección. Este ambiente pro-inflamatorio podría estimular a la CEM-GW e inducir respuestas antimicrobianas potencialmente aumentadas, relacionadas con mecanismos antibacterianos indirectos.

Conociendo esta información se podría llegar a considerar estrategias que logren aumentar la expresión y secreción de los péptidos antimicrobianos para mejorar su efecto benéfico en el contexto de aplicaciones terapéuticas como la terapia celular basada en CEM-GW una vez sean trasplantadas y reducir de este modo que el riesgo de infección del receptor del producto terapéutico celular.

Bibliografía

1. OMS, *Organización Mundial de la Salud*, OMS, Editor. 2019.
2. OMS, *Informe sobre la salud del mundo 2017*. Ginebra. 2017, Organización Mundial de la Salud
3. Tabares, V.R. *Resistencia bacteriana en la mira de investigadores*. 2016 [cited 2018].
4. González García, M., et al., *Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas*. 2017. Vol. 69. 2017.
5. Meisel, R., et al., *Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase*. *Leukemia*, 2011. **25**(4): p. 648.
6. Klimczak, A. and U. Kozłowska, *Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 4285215.
7. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
8. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. *Stem cells*, 2004. **22**(7): p. 1330-1337.
9. Ariff, B. and F. Chui, *The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord*. *Stem Cell*, 2015: p. 1-15.
10. Paredes, F. and J.J. Roca, *Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana*. *Offarm*, 2004. **23**(3): p. 116-124.
11. Calvo, J. and L. Martínez-Martínez, *Mecanismos de acción de los antimicrobianos*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2009. **27**(1): p. 44-52.
12. Nguyen, L.T., E.F. Haney, and H.J. Vogel, *The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action*. *Trends Biotechnol*, 2011. **29**(9): p. 464-72.
13. Casares, D., P.V. Escribá, and C.A. Rosselló, *Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(9): p. 2167.

14. Kapoor, G., S. Saigal, and A. Elongavan, *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology, 2017. **33**(3): p. 300-305.
15. Yoneyama, H. and R. Katsumata, *Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(5): p. 1060-75.
16. Zhang, L.-j. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides*. Current Biology, 2016. **26**(1): p. R14-R19.
17. Van Epps, H.L., *René Dubos: unearthing antibiotics*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(2): p. 259-259.
18. Bahar, A.A. and D. Ren, *Antimicrobial peptides*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2013. **6**(12): p. 1543-1575.
19. Aysenur, Y., et al., *Natural-based Antibiofilm and Antimicrobial Peptides from Microorganisms*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018. **18**(24): p. 2102-2107.
20. Cassatella, M.A., et al., *Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils*. Stem Cells, 2011. **29**(6): p. 1001-11.
21. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
22. Téllez, G.A. and J.C. Castaño, *Péptidos antimicrobianos*. Infectio, 2010. **14**: p. 55-67.
23. Shai, Y., *Mode of action of membrane active antimicrobial peptides*. Biopolymers, 2002. **66**(4): p. 236-48.
24. Jenssen, H., P. Hamill, and R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): p. 491-511.
25. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 238-50.
26. Marchand, C., et al., *Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): p. 5157-65.
27. Meade, K.G. and C. O'Farrelly, *β -Defensins: Farming the Microbiome for Homeostasis and Health*. Frontiers in Immunology, 2019. **9**(3072).
28. da Silva, F.P. and M.C.C. Machado, *Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications*. Peptides, 2012. **36**(2): p. 308-314.
29. Doss, M., et al., *Human defensins and LL-37 in mucosal immunity*. Journal of leukocyte biology, 2010. **87**(1): p. 79-92.
30. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
31. Forrellat Barrios, M. and N. Fernández Delgado, *Hepcidina: nueva molécula, nuevos horizontes*. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 2004. **20**: p. 0-0.
32. Michels, K., et al., *Hepcidin and Host Defense against Infectious Diseases*. PLoS pathogens, 2015. **11**(8): p. e1004998-e1004998.
33. Lombardi, L., et al., *Insights into the antimicrobial properties of hepcidins: advantages and drawbacks as potential therapeutic agents*. Molecules, 2015. **20**(4): p. 6319-41.
34. Alfonso García, G., et al., *Aspectos biomédicos de la familia de las lipocalinas*. Universitas Medica, 2007. **48**(2): p. 118-128.

35. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein*. *Biometals*, 2006. **19**(2): p. 211-5.
36. Dittrich, A.M., H.A. Meyer, and E. Hamelmann, *The role of lipocalins in airway disease*. *Clin Exp Allergy*, 2013. **43**(5): p. 503-11.
37. Berger, T., et al., *Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(6): p. 1834-9.
38. Goetz, D.H., et al., *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition*. *Mol Cell*, 2002. **10**(5): p. 1033-43.
39. Cederlund, A., G.H. Gudmundsson, and B. Agerberth, *Antimicrobial peptides important in innate immunity*. *Febs j*, 2011. **278**(20): p. 3942-51.
40. Wang, S., et al., *Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(5).
41. Batoni, P., et al., *Rational modification of a dendrimeric peptide with antimicrobial activity: Consequences on membrane-binding and biological properties*. *Amino Acids*, 2016. **48**: p. 887-900.
42. Kfoury, Y. and D.T. Scadden, *Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche*. *Cell Stem Cell*, 2015. **16**(3): p. 239-53.
43. Flores-Figueroa, E., J.J. Montesinos, and H. Mayani, *[Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application]*. *Rev Invest Clin*, 2006. **58**(5): p. 498-511.
44. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
45. Watson, N., et al., *Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells*. *Cytotherapy*, 2015. **17**(1): p. 18-24.
46. Gronthos, S., et al., *Stem cell properties of human dental pulp stem cells*. *J Dent Res*, 2002. **81**(8): p. 531-5.
47. Panepucci, R.A., et al., *Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2004. **22**(7): p. 1263-78.
48. Hua, J., et al., *Small Molecule-Based Strategy Promotes Nucleus Pulposus Specific Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*. *Mol Cells*, 2019. **42**(9): p. 661-671.
49. Maurer, M., *Proteomic Definitions of Mesenchymal Stem Cells*. *Stem cells international*, 2011. **2011**: p. 704256.
50. Alcayaga-Miranda, F., J. Cuenca, and M. Khoury, *Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies*. *Frontiers in immunology*, 2017. **8**: p. 339.
51. Krasnodembskaya, A., et al., *Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37*. *Stem Cells*, 2010. **28**(12): p. 2229-38.
52. Gonzalez-Rey, E., et al., *Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis*. *Gut*, 2009. **58**(7): p. 929-39.
53. Lalu, M.M., et al., *Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47559.

54. Li, Z., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cell-loaded amniotic membrane for the repair of radial nerve injury*. Neural Regen Res, 2013. **8**(36): p. 3441-8.
55. Kong, C.M., et al., *Manufacturing of human Wharton's jelly stem cells for clinical use: selection of serum is important*. Cytotherapy, 2019. **21**(4): p. 483-495.
56. Bastawrous, M., et al., *Wharton's Jelly Stem Cells*. 2016. p. 257-276.
57. Kim, D.-W., et al., *Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(6): p. 11692-11712.
58. Liau, L.L., et al., *Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells*. Current Research in Translational Medicine, 2019.
59. Yoon, J.H., et al., *Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly*. BioMed Research International, 2013. **2013**.
60. Loria, C.R., *Cinetica Microbiana*. 2016.
61. López Vargas, J.A. and L.M. Echeverri Toro, *K. pneumoniae: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia*. Iatreia, 2010. **23**(2): p. 157-165.
62. Olsen, I., *Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015. **34**(5): p. 877-86.
63. Zendejas-Manzo, G.S., H. Avalos-Flores, and M.Y. Soto-Padilla, *General microbiology Staphylococcus aureus: Characteristics and methods of identifying pathogenicity*. Revista Biomédica, 2014. **25**(3): p. 129-143.
64. Ortega-Peña, S. and R. Franco-Cendejas, *Importancia médica del biofilm de Staphylococcus epidermidis en las infecciones de prótesis articular*. Invest Discap, 2014. **3**(3): p. 106-113.
65. Harman, R.M., et al., *Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 157.
66. Hincapié Mejía, G.M., et al., *Evaluación de la degradación de E. coli empleando un fotorreactor de discos rotatorios*. Ingeniería e Investigación, 2007. **27**: p. 65-69.
67. Arias Palacios, J., et al., *Comparación de la actividad antimicrobiana de meropenem genérico y meropenem innovador por la técnica de micro dilución en cepas resistentes*. Revista Cubana de Farmacia, 2015. **49**: p. 0-0.
68. Tao, Z., et al., *Impact of the Staphylococcus epidermidis LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and global transcriptional profile*. BMC microbiology, 2010. **10**: p. 287.
69. Biedermann, A., et al., *Interactions of anaerobic bacteria with dental stem cells: an in vitro study*. PloS one, 2014. **9**(11): p. e110616-e110616.
70. Macías-Abraham, C., et al., *Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales*. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 2010. **26**(4): p. 256-275.
71. Ranzato, E., et al., *Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8b): p. 2030-8.
72. Benavente, R., et al., *Enantioselective oxidation of galactitol 1-phosphate by galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase from Escherichia coli*. Acta Crystallographica Section D, 2015. **71**(7): p. 1540-1554.

73. Becherucci, V., et al., *Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience*. Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 124.