

LA HIPERGLUCEMIA AFECTA LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS DEL CORDÓN UMBILICAL DE HIJOS DE EMBARAZADAS CON DIABETES MELLITUS PREGESTACIONAL

Reyes-Muñoz Enrique, Domínguez-Castro Mauricio, Domínguez-Galicia Arely, Montoya-Estrada Araceli, Romo-Yáñez José.

Coordinación de Endocrinología Ginecológica y Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México. *Corresponding autor: jryz@yahoo.com (J. Romo-Yáñez).

Introducción: La diabetes mellitus durante el embarazo constituye un mayor riesgo de morbi-mortalidad perinatal, con una alta incidencia de malformaciones congénitas (MC). Los defectos del tubo neural son el segundo tipo más común de MC en hijos de madres diabéticas (HMD), quienes también tienen un alto riesgo de sufrir trastornos del neurodesarrollo y discapacidades intelectuales. Los mecanismos que conducen a estos trastornos neuronales en HMD aún no se comprenden completamente

Objetivo: Comparar si la hiperglucemia afecta la proliferación, diferenciación y expresión neuronal en células de cordón umbilical en HMD versus hijos de mujeres normoglucémicas (HMNG).

Métodos: Muestras de cordón umbilical de hijos de mujeres con embarazo de término nomoglucémicas (HMNG) e hijos de mujeres con diabetes mellitus pregestacional (HMD). Se aislaron y caracterizaron células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia, RT-PCR y fueron inducidos a diferenciarse en adipocitos, osteocitos y neuronas. Se realizaron ensayos de proliferación para determinar el tiempo de duplicación y se evaluó la expresión génica de los RNA mensajeros de Nestina, TUBB3, FOXO1, KCNK2, LMO3 y MAP2 mediante RT-PCR semicuantitativa.

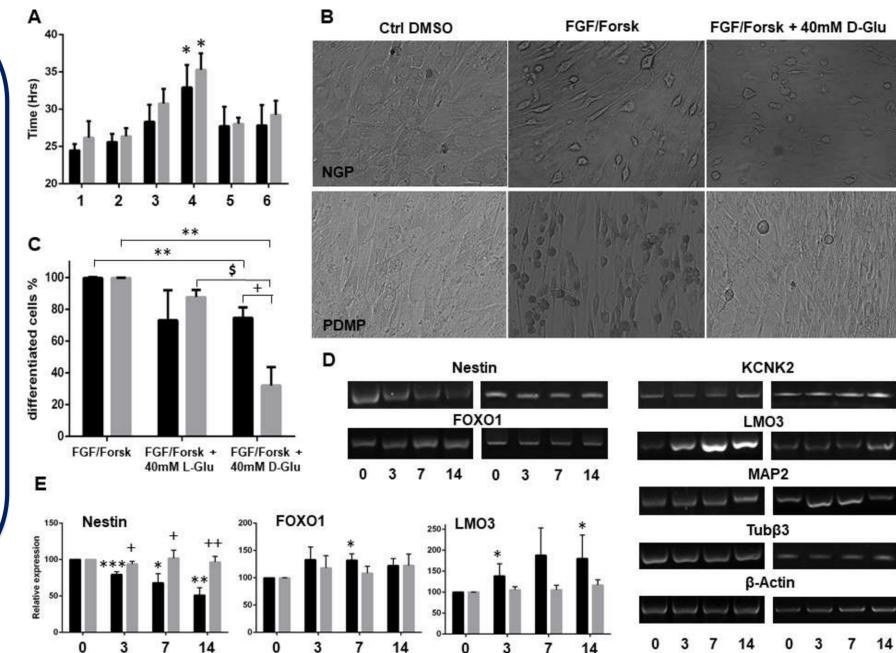


Figura 3.- A). Tiempos de duplicación de hUCWJMSC aisladas de HMNG (barras negras) y HMD (barras grises) en condiciones de control (carril 1) y con 20, 30 y 40mM de D-glucosa (carriles 2, 3 y 4 respectivamente) y en control osmolar (30 y 40 mM de L-glucosa, carriles 5 y 6 respectivamente). *Representa diferencias estadísticamente significativas con respecto al control B). Imágenes representativas de hUCWJMSC inducidas a diferenciación neuronal en condiciones de control (con DMSO y sin FGFb/forskolina) y diferenciadas con FGF2/Forskolina y FGF2/Forskolina con 40mM de D-glucosa en células aisladas de HMNG (arriba) e HMD (abajo), aumento de 100X. C). Porcentaje de células diferenciadas en tratamiento con FGF2/forskolina (control positivo), control osmolar (FGF2/forskolina + 40mM L-glucosa) y diferenciadas con FGF2/forskolina + 40mM D-glucosa, en células aisladas de HMNG (barras negras) y HMD (barras grises). D) Imágenes representativas de la expresión de ARNm de nestina, FOXO1, KCNK2, LMO3, MAP2 y Tubβ3 en diferentes puntos temporales (0, 3, 7 y 14 días) durante la diferenciación neuronal en hUC-WJMSC de HMNG (barras negras) e HMD (barras grises). β-actina se utilizó como control de carga. E) Expresión relativa de mRNA de Nestina, FOXO1, KCNK2 y LMO3 durante la diferenciación neuronal de hUC-WJMSC aisladas de HMNG (barras negras) e HMD (barras grises). Diferencias estadísticamente significativas *p<0,005, **p<0,001, ***p<0,0001, respecto al control, prueba t de Student.

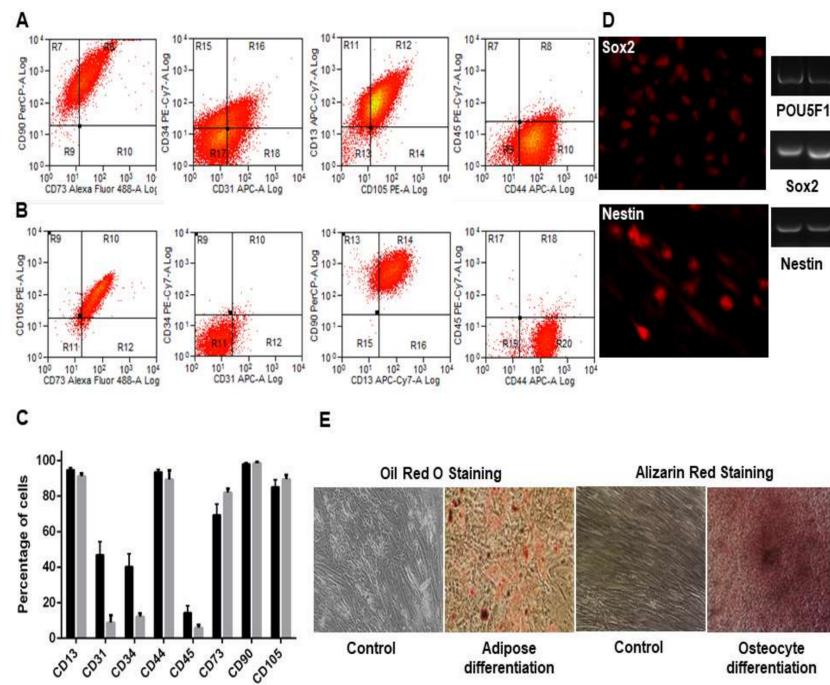


Figura 1.- Aislamiento y caracterización de hUCWJMSC. Gráficos representativos de las células con expresión de marcadores de células troncales mesenquimales (MSC) CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105, marcadores de células hematopoyéticas CD34 y CD45 y marcador de células endoteliales CD31, antes (A) y después (B) del FACS. C). Gráfico del porcentaje de células con la expresión de los marcadores antes mencionados en la población celular, antes (barras negras) y después (barras grises) de la separación por FACS. D). Imágenes representativas de la expresión de marcadores de células troncales POU5F1, Sox2 y Nestina a nivel de mRNA y/o proteína en hUCWJMSC aisladas por FACS. MI). Imágenes representativas de la diferenciación adiposa y en osteoblastos de hUCWJMSC después de la separación por FACS.

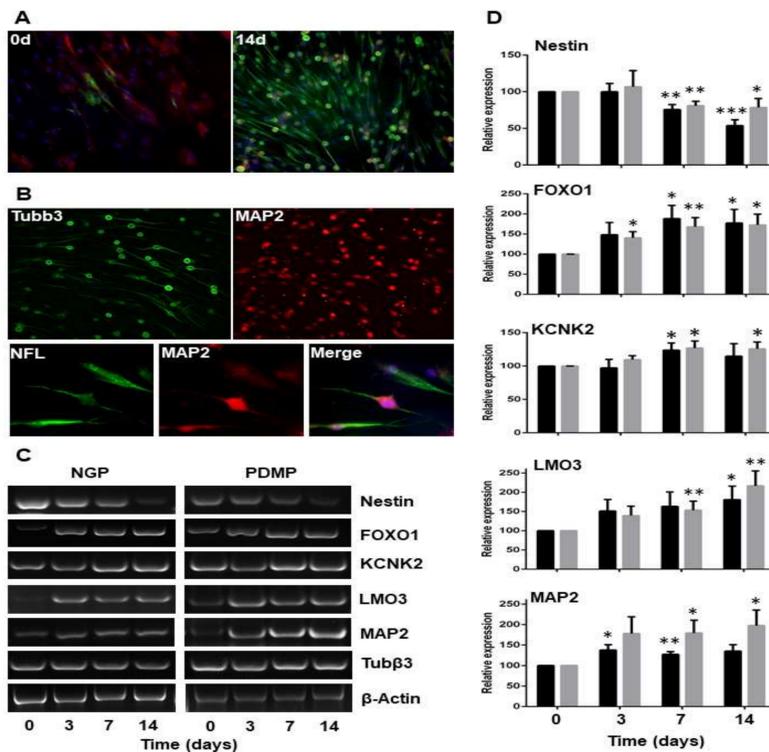


Figura 2.- Diferenciación neuronal de células hUCWJMSC. A). Imágenes representativas de inmunotinción celular con anticuerpo policlonal anti-nestina (rojo) y anticuerpo monoclonal anti-TUBB3 (verde) en células hUCWJMSC a los 0 y 14 días después de la inducción de la diferenciación neuronal. Aumento de 100X. B). Imágenes representativas de la coexpresión de TUBB3 y MAP2 (arriba, amplificación 100X), así como NFL con MAP2 (abajo, amplificación 400X) en células diferenciadas durante 14 días. C). Imágenes representativas de la expresión relativa de los mRNA de Nestina, FOXO1, KCNK2, LMO3, MAP2 y TUBB3 en diferentes tiempos (0, 3, 7 y 14 días) durante la diferenciación neuronal en hUCWJMSC de HMNG e HMD. Se usó β-actina como control de carga. D). Gráficos de la expresión relativa de los mRNA de Nestina, FOXO1, KCNK2, LMO3 y MAP2 durante la diferenciación neuronal de hUC-WJMSC aisladas de HMNG (barras negras) e HMD (barras grises). *, ** y *** muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a 0d, de p<0.005, p<0.001 y p<0.0001 respectivamente, con prueba t de Student.

Conclusiones: Las células de cordón umbilical hUC-WJMSC expuestas a 40mM D-glucosa muestran cambios en la diferenciación y expresión troncal y neuronal, principalmente en células procedentes de HMD comparados con los HMNG. La nestina ve alterada su expresión en la inducción de las células hUC-WJMSC a concentraciones de 40 mM en las células procedentes de HMD. Las células troncales derivadas de las hUC-WJSC y diferenciadas en células neuronales podrían ser un indicador útil de los efectos nocivos de la hiperglucemia en los tejidos fetales, ya que representa al feto desde el punto de vista embriológico, fisiológico y genético.

Referencias

- Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, et al. Induction of dopaminergic neurons from human Wharton's jelly mesenchymal stem cell by forskolin. *J Cell Physiol.* Feb 2014;229(2):232-44.
- Rudland VL, Price SAL, Hughes R, et al. ADIPS 2020 guideline for pre-existing diabetes and pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* Dec 2020;60(6):E18-e52.
- Ramya S, Shyamasundar S, Bay BH, et al. Maternal Diabetes Alters Expression of MicroRNAs that Regulate Genes Critical for Neural Tube Development. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:237.
- Banitalebi Dehkordi M, Madjd Z, Chaleshtori MH, et al. A Simple, Rapid, and Efficient Method for Isolating Mesenchymal Stem Cells From the Entire Umbilical Cord. *Cell Transplant.* 2016;25(7):1287-97.

Resultados: La hiperglucemia disminuyó significativamente la proliferación en las células HMNG e HMD tratadas con D-glucosa 40 mM. El porcentaje de diferenciación neuronal disminuye significativamente al 74,52% y 32,02% en condiciones de hiperglucemia en células de HMNG e HMD, respectivamente. En condiciones glucémicas de control, la expresión de RNA mensajero de nestina disminuyó durante la diferenciación neuronal en células de HMNG e HMD, mientras que la expresión de RNA mensajero de FOXO1, KCNK2, LMO3 y MAP2 aumentó durante la diferenciación neuronal en células HMNG y HMD. Por otro lado, en condiciones de hiperglucemia, la nestina disminuyó significativamente en las células de HMNG, pero no en HMD, mientras que la expresión de RNA mensajero de FOXO1 y LMO3 aumentó significativamente en las células de HMNG, pero no en HMD.

Agradecimientos : Al Instituto Nacional de Perinatología.

Financiamiento: Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Perinatología (No. 2019-1-29).