



*Cuantificación de TIMP-2 en plasmas de sangre de cordón umbilical de neonatos colombianos y su correlación con variables neonatales utilizando el método CBA en citometría de flujo*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ  
OCTUBRE 2019



*Cuantificación de TIMP-2 en plasmas de sangre de cordón umbilical de neonatos colombianos y su correlación con variables neonatales utilizando el método CBA en citometría de flujo*

Valerie Niyireth Cárdenas López

Laura Vanessa Guevara Sotelo

Proyecto de grado para optar por el título de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Asesora interna

Omaira Yaneth López Castro MSc. en Infecciones y Salud en el Trópico

Asesora externa

Luz Mabel Ávila Portillo cPhD. en Ciencias Farmacéuticas

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ

NOVIEMBRE 2019

## DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a nuestras familias, quienes han dedicado su vida a nuestro beneficio y por el infinito apoyo que nos han dado a lo largo de nuestra carrera y vida para conseguir un futuro brillante.

## AGRADECIMIENTOS

Mamá, Papá, nunca serán suficientes las palabras para agradecer todo lo que hacen a diario por mi y para mi, por ustedes soy lo que soy, por ustedes quiero crecer y ser mejor persona cada día, ser su hija es algo que me llena de orgullo cada día. Esto es de ustedes. Hermana, pequeña yo, te amo aunque no lo demuestre a menudo, eres mi orgullo y mi inspiración, sigue por favor llenando de orgullo a esta familia. Amigos, la familia que escogí, aquellos compañeros de lucha, aquellos que cada día me llevaron a dar una mejor versión de mi, que me sacaron una sonrisa en los momentos difíciles, que me enseñaron a no desfallecer, a seguir adelante aunque fuera duro, que con sus risas y llantos me han demostrado que la lealtad existe y que cada día se puede estar un poco más loco. Gracias a todos.

Valerie.

Porque hasta el último momento de mi vida no podré terminar de agradecer todo lo que han hecho por mí. Papá, mamá, hermano, tíos, abuelos, primos y amigos, por todos ellos he llegado hasta aquí.

Laura.

Agradecemos a la Doctora Mabel Ávila por abrirnos las puertas de STEM Medicina Regenerativa y permitirnos aprender y conocer el mundo de la investigación al realizar este proyecto. A la Doctora Yaneth López por su apoyo. A la Doctora Jenniffer por su paciencia. A la Doctora Ginna Saavedra por su compromiso y en general a STEM Medicina Regenerativa por ser parte de esta etapa en nuestras vidas.

## Tabla de contenido

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo general	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. ANTECEDENTES	11
4. MARCO TEÓRICO	22
4.1. Fisiología y anatomía del Cordón umbilical	22
4.2. Sangre y plasma de sangre de Cordón Umbilical	23
4.3. Generalidades y funciones de los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP)	24
4.4 TIMP-2	25
4.4.1. Estudios en modelo animal.	26
4.4.2. Estudios en humanos	27
4.5. Técnicas utilizadas para la cuantificación de TIMP-2	28
4.5.1 ELISA (Método enzimático).	28
4.5.2. Citometría de Flujo.	28
4.5.3. Cytometric bead array CBA (perlas de captura citométricas).	30
4.6. Fisiología y anatomía del Hipocampo	32
4.7. Enfermedad de Alzheimer	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Clasificación del diseño de investigación	34
5.2. Población	34
5.3. Selección y tamaño de la muestra	34
5.4. Criterios de inclusión y de exclusión	34
Criterios de inclusión	34
Criterios de exclusión.	34
5.5. Variables	35
5.5.1. Variables neonatales y perinatales.	35
5.5.2. Variables dependientes.	35
5.5.3. Variables independientes.	35
5.6. Obtención y procesamiento de muestras	37
5.7. Determinación de TIMP-2.	37
6. PLAN DE ANÁLISIS	39

6.1 Análisis de datos	39
6.2 Análisis estadístico	39
7. RESULTADOS	40
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	49
10. ASPECTOS ÉTICOS	50
REFERENCIAS	52
ANEXOS	62
1. CONSENTIMIENTO INFORMADO	62
2. BASE DE DATOS SELECCIÓN DE MUESTRAS	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión y de exclusión para la selección de muestras.	34
Tabla 2. Definición de las variables.	36
Tabla 3. Características de 60 unidades de plasma de sangre de cordón umbilical y de los donantes.	40
Tabla 4. Correlaciones entre factores neonatales y el contenido de sangre de cordón umbilical	42
Tabla 5. Comportamiento de TIMP-2 con respecto a los intervalos de las Variables estudiadas.	43
Tabla 6. Base de datos de las muestras analizadas.	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes del cordón umbilical	22
Figura 2. Generación de fluorescencia.	29
Figura 3. Composición general de los tres sistemas de un citómetro de flujo.	30
Figura 4. Procedimiento perlas de captura.	31
Figura 5. Protocolo de procesamiento del Kit LEGENDplex™ Human TIMP Mix and Match	38
Figura 6. Variables correlacionadas con el contenido de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical	41



## RESUMEN

El Inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2 (TIMP-2) cumple un papel esencial en el funcionamiento de la barrera hematoencefálica, la regulación de la neuroinflamación y renovación del hipocampo. Su concentración se encuentra aumentada en el plasma de sangre de cordón umbilical (SCU) y disminuye con el aumento de la edad, contribuyendo al deterioro progresivo del hipocampo. Estudios en modelo animal sugieren que el plasma de sangre de cordón umbilical contiene TIMP-2 y que los ratones viejos adquieren habilidades de memoria y temporoespaciales posterior a la infusión de plasmas jóvenes. Dado lo anterior, esta proteína está siendo investigada para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Este trabajo se realizó en STEM medicina Regenerativa, donde se obtuvo y procesó el plasma de SCU de 60 neonatos. Para la identificación y cuantificación de TIMP-2, se utilizó la técnica Cytometric Bead Array (CBA), con el Kit LEGENDplex™ Human TIMP Mix and Match. Los archivos FCS arrojados por el citómetro de flujo FACSCanto™ II fueron analizados por el software especializado LEGENDplex, y por medio de herramientas estadísticas como shapiro-wilk, coeficiente correlación de rango de Spearman y el programa estadístico STATA versión 12 del Hospital Militar Central de Bogotá, se realizó el análisis estadístico. Se encontró correlación de TIMP-2 con el volumen, CD34+ y CNT. Sin embargo, no se encontró correlación de TIMP-2 con las demás variables neonatales consideradas.

***Palabras clave: TIMP-2, CBA, Alzheimer, hipocampo, plasma de sangre de cordón umbilical.***

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas tipo Alzheimer, son un problema de salud pública que afecta a gran parte de la población mundial, es por esto, que crear estrategias para contrarrestarlas son un reto para la comunidad científica. Un estudio realizado por la Universidad de Stanford en el 2017<sup>39</sup>, identificó al Inhibidor Tisular de las Metaloproteinasas 2 (TIMP-2) en plasma de SCU, proteína capaz de revitalizar el hipocampo. Su concentración se encuentra aumentada en el plasma de SCU y va decreciendo con el aumento de la edad, siendo postulada como blanco terapéutico para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Aún existen vacíos sobre la relación existente entre el plasma de SCU y TIMP-2, como por ejemplo, qué factores neonatales podrían afectar su concentración y qué impacto podría dar a la investigación científica al encontrar alguna relación de estos factores con TIMP-2, dando lugar al inicio de nuevas preguntas e investigaciones.

Esta investigación, pertenece a una línea de estudio que pretende ampliar el conocimiento sobre la relación entre la concentración de TIMP-2 en plasma de SCU, con variables neonatales, y su impacto en enfermedades neurodegenerativas. Para ello, se identificó y cuantificó TIMP-2 en 60 plasmas de SCU, obtenidos y procesados en STEM Medicina Regenerativa, y se correlacionó su presencia y concentración con variables neonatales usando CBA. Este estudio podría ser tenido en cuenta para la selección de una muestra de sangre de cordón umbilical que cumpla con las condiciones necesarias para la obtención de TIMP-2.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Cuantificar la proteína TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical y correlacionar su presencia con variables neonatales en recién nacidos colombianos, utilizando el método CBA para citometría de flujo.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Identificar TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical por el método CBA para citometría de flujo.
- Correlacionar estadísticamente las variables neonatales que afectan la concentración de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical.

### 3. ANTECEDENTES

Harper, E 1980<sup>1</sup> definía la colagenasas como enzimas obtenidas de organismos procariotas y eucariotas, que rompen las cadenas polipeptídicas helicoidales del cuerpo principal de la proteína estructural del colágeno. Están involucradas en varios roles normales del desarrollo, sin embargo, es posible encontrarlas en tejido de pacientes enfermos por ejemplo con artritis reumatoidea y tumores invasivos. Existen 4 tipos de colagenasa, dentro de las que se encuentran la tipo I, que se encuentra mayormente en piel; la colagenasa tipo II producida en el cartílago, retina, córnea y cuerpo vítreo. La tipo III presente en vasos sanguíneos, piel embrionaria, pulmones, músculos e hígado. El tipo IV se encuentra en membranas basales<sup>1</sup>.

En Estados Unidos, en el año 1989, Stetler-Stevenson et al<sup>2</sup> descubren una nueva proteína perteneciente a la familia de los inhibidores de metaloproteinasas que nombran TIMP-2, en 1992 Rosenberg et al<sup>3</sup>, encuentran en ratones TIMP-2, participando en la inactivación de la colagenasa IV, proteína implicada en el infarto cerebral, dando lugar a hemorragias y coágulos, que posteriormente producen necrosis del tejido neuronal; además, TIMP-2 ayudó en la recuperación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, dando a conocer su papel en la reparación de la lesión cerebral, y se recomendó su uso en tratamientos implicados en este tipo de lesiones<sup>3</sup>.

En 1997, Blavier et al<sup>4</sup> definió a las *metaloproteinasas* (MMP) como endopeptidasas encontradas en la matriz extracelular (MEC) y que pueden diferenciarse en distintos tipos. En la MEC existe un equilibrio gracias a los *Inhibidores de metaloproteinasas* TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, los TIMP y las MMP ayudan en la remodelación de la MEC, sin embargo, Blavier menciona que podrían desempeñar adicionalmente otra clase de funciones, como la proliferación celular o apoptosis, al encontrar RNAm de TIMP-2 en pulmones, piel, órganos reproductivos y en cerebro de ratones adultos y en embriones; especialmente en la Placenta y el tejido neuronal. En cuanto a los embriones de ratones se encontró abundante RNAm TIMP-2 en la placenta, especialmente en el tejido mesenquimatoso.

Escudos LE et al<sup>5</sup>, realizaron un estudio donde se evaluó la frecuencia de las células madre progenitoras hematopoyéticas CD34+ durante la gestación. Se evidencio que la cantidad de células madre se encuentra aumentada en la edad gestacional temprana (17-24 semanas), a diferencia de la edad gestacional a término, donde se evidencio que la cantidad de células CD34+ disminuye linealmente.

Janowska-Wieczorek et al<sup>7</sup>, descubrieron que las células CD34+ de sangre periférica, secretan constitutivamente TIMP-1 y TIMP-2, además de encontrar transcriptoma de TIMP-1 y TIMP-2 en las células CD34+ de médula ósea. Los neutrófilos, monocitos y linfocitos secretan TIMP-1. Este estudio proporciona evidencia de que las células progenitoras hematopoyéticas humanas inmaduras secretan TIMP-2.

Ballen KK et al<sup>8</sup>, estudiaron el efecto de las características neonatales sobre la obtención de CD34+, descubriendo que el volumen de sangre del cordón umbilical recolectado está correlacionado positivamente con los recuentos de células CD34+ x10<sup>6</sup> (0,07 - 25,2). El peso del recién nacido, se correlacionó positivamente con todas las variables. Los bebés más grandes tenían más probabilidades de producir unidades de sangre del cordón umbilical con volúmenes más grandes y recuentos de células CD34+ más altos. Finalmente, encontraron que la edad materna no se correlacionó con los valores de CD34+.

Maymon E et al<sup>9</sup>, evidenciaron que la degradación de la MEC conduce a la degradación de las membranas amnióticas y corion, atribuyendoselo a la actividad enzimática excesiva de las gelatinasas MMP-2. La MMP-2 se expresa en las membranas fetales, tiene una distribución ubicua, se activa e inhibe en la superficie celular por TIMP-2 además de ser la gelatinasa más encontrada en líquido amniótico. En el estudio se encontró que las concentraciones de TIMP-2 disminuyen con el trabajo de parto (término y pretérmino), ruptura de membranas (término y pretérmino) y con infección intrauterina, debido a que las endotoxinas bacterianas

disminuyen la síntesis de proteínas de TIMP-2, debido a la apoptosis celular. Este estudio propone que TIMP-2 participa en la remodelación de la membrana durante el embarazo normal, el aumento de la actividad de TIMP-2 con el avance de la edad gestacional puede desempeñar un papel homeostático al inhibir los efectos de las MMP producidas en respuesta a fuerzas mecánicas durante la distensión uterina.

El CBA, surge de la necesidad de analizar y cuantificar múltiples analitos en un volumen de muestra bajo y en un menor tiempo. La detección de antígenos puede darse ya sea por la unión de estos a anticuerpos monoclonales presentes en una perla marcados con un fluorocromo diferente; o por medio de señales de fluorescencia específica y reactivos de detección que llevan un segundo tipo de señal fluorescente. Morgan et al<sup>10</sup>, se centran en la variedad de aplicaciones de la tecnología CBA; donde se evidencia su uso para medición de citoquinas, mediadores inflamatorios derivados del complemento, moléculas de señalización intracelular, citoquinas y señalización del factor de crecimiento, apoptosis y detección y cuantificación de anticuerpos específicos.

Nakagawa, R et al<sup>11</sup> investigaron aquellas variables gestacionales que pueden afectar la calidad de una muestra de cordón umbilical, tales como la longitud del cordón, el peso de la placenta y el peso del recién nacido, las cuales se correlacionaron positivamente con buen volumen de CB. También se encontró correlación con variables como el sexo de los recién nacidos y la edad gestacional, con una concentración elevada de células nucleadas totales (TNC).

Para el año 2005, Jaworski y sus colaboradores<sup>12</sup> realizaron un estudio más detallado en la amígdala cerebral, parte encargada del condicionamiento del miedo, donde se evidenció que la expresión de TIMP-2 se encuentra mayormente en el hipocampo, en las células granulares del giro dentado, y en la amígdala. En la investigación suprimieron TIMP-2 en un grupo de ratones quienes fueron sometidos a diferentes pruebas para medir su comportamiento: inhibición prepulso y sobresalto potenciado. En los resultados se observó que TIMP-2 debe estar implicada en

algunos mecanismos reguladores de la respuesta neuronal frente a situaciones donde es necesario memorizar y hacer uso de la ubicación espacial, adicionalmente; los autores mencionan que esta proteína podría estar implicada en la plasticidad sináptica<sup>12</sup>.

Jaworski y sus colaboradores<sup>13</sup> en el 2006 estudiaron la función que cumple el TIMP-2 en la maduración neuromuscular en ratones. Los resultados obtenidos en el Sistema Nervioso Central (SNC), más específicamente en el cerebro y médula espinal, revelaron que el ARNm de TIMP-2, tiene la capacidad de expresarse y aumentar a lo largo del desarrollo postnatal en ratones. Se midió también en médula espinal, donde se detectó que TIMP-2 se expresa en toda la materia gris, observándose mayores picos de expresión en los cuernos dorsal (por neuronas motoras) y ventral. También observaron que en cerebelo TIMP-2 juega un papel muy importante en la proliferación y migración de células granulares, y a su vez, se cree que ayuda a la diferenciación de las células de Purkinje<sup>13</sup>.

Por otro lado, la expresión de los transcritos de TIMP-2 en el SNC difirió de la expresión en el músculo esquelético, aunque la expresión del ARNm de TIMP-2 disminuye durante el desarrollo del músculo esquelético, la expresión de la proteína TIMP-2 no cambia, sin embargo, aún es incierta su función en el músculo, se presume de una actividad protectora. Se conoce que TIMP-2 desempeña un papel en el mantenimiento de la homeostasis de la lámina basal durante la actividad muscular. De igual manera, se corroboró que la actividad incrementada de MMP se debe a una disminución de la expresión de TIMP-2, y por la contracción muscular<sup>13</sup>.

En el 2007, Cockle JV et al<sup>14</sup> demostró que los nacimientos prematuros y las complicaciones maternas, están relacionados con la degradación de la MEC por MMP como consecuencia de procesos inflamatorios y/o desequilibrios entre MMP y TIMPS. Altas concentraciones de MMP y de la relación entre MMP y TIMPs en líquido amniótico o en moco endocervical durante el embarazo y en los bebés, pueden contribuir a identificar los que tienen riesgo de desarrollar complicaciones.

Para neonatos prematuros o madres embarazadas con riesgo de parto prematuro, se piensa en un posible tratamiento con inmunomoduladores de MMP, siendo los TIMPs sus principales inhibidores, pensado en usarse para la investigación obstétrica y pediátrica.

En 2008 Montalvo<sup>15</sup>, en su tesis doctoral utilizó células de cordón umbilical provenientes de gelatina de Wharton en ingeniería tisular; por ello, el cordón umbilical se ha convertido en un elemento de interés para la medicina regenerativa, debido a la funcionalidad de las células aquí presentes. Este tejido permite la unión entre la placenta y el feto, tiene una longitud de 60-65 cm y permite la vascularización fetal al estar compuesto por una vena y dos arterias cubiertas por un tejido conectivo mucoso llamado gelatina de Wharton. Ésta, suple la función de adventicia y permite la regulación del flujo sanguíneo del cordón umbilical.

El DANE<sup>16</sup>, en el año 2006, describe la definición general de variable y neonatal, así mismo y menciona múltiples variables usadas por los investigadores como la edad gestacional, talla, peso, tipo de parto y sexo.

En el 2010, Brew y Nagase<sup>17</sup> realizaron una revisión sobre los TIMP, describiendo las funciones estructurales que pueden desempeñar además de la inhibición de las MMPs, sus características generales y similitudes que hay entre los cuatro TIMPs identificados, mencionan su presencia en otros mamíferos y en invertebrados, muestran la estructura general de los TIMPs y mencionan sus espectros de inhibición en donde TIMP-3 tiene el mayor, de TIMP-2 mencionan su importancia en el sistema nervioso, lugar donde podría estar implicado en funciones muy relevantes como la memoria.

Como se ha visto en los estudios mencionados hasta ahora, TIMP-2 podría ser un colaborador para terapias en enfermedades neurodegenerativas, cabe resaltar que en Colombia, para el año 2010, un estudio realizado por Ruiz et al<sup>18</sup>, determinó una



prevalencia de enfermedad Alzheimer (EA) del 1.8 y 3.4% en grupos de pacientes mayores a 65 y 75 años respectivamente. Una recopilación de datos, demostró que en Europa, hay un estimado de 850.000 casos de EA. En ausencia de un tratamiento curativo para la EA, se calcula que la sobrevivencia de un paciente puede ser de 5 a 10 años en promedio<sup>18</sup>.

Madsen-Bouterse, et al para el 2010<sup>19</sup>, en su estudio habla acerca del síndrome de respuesta inflamatoria fetal (FIRS) que aparece en los recién nacidos prematuramente y su evaluación a través de interleucina plasmática (IL) -6, proteína C reactiva, en cordón umbilical, lo realizó en 10 prematuros sin y 10 con FIRS. Debido a que los mecanismos moleculares para desarrollar FIRS en el recién nacido son aún desconocidos, por lo tanto en este estudio se evaluó el ARNm proveniente de la sangre de cordón umbilical. Se encontraron mecanismos como el procesamiento y presentación de antígenos, antiapoptosis, respuestas inmunes e inflamatorias, así como procesos críticos para el metabolismo celular. Una serie de funciones moleculares enriquecidas se relacionaron con la transducción de señales y la actividad de transferasa. También se identificaron vías metabólicas y de señalización significativamente asociadas con los datos de expresión génica.

En el mismo año 2010, Chandra et al<sup>20</sup> decide realizar un estudio sobre el recuento de CD34+ en la sangre de cordón umbilical, encontrando que una de las variables que más se correlacionó es el volumen, siguiendo el año 2012, Wen et al<sup>21</sup>, querían identificar factores obstétricos y neonatales que pudieran afectar el volumen de SCU y así poder ayudar a los bancos de sangre a mejorar en sus criterios inclusivos de donación y la calidad de la Sangre de cordón Umbilical<sup>21</sup>. Una de las técnicas más usadas en los bancos de sangre o en las áreas de hematología es la citometría de flujo, esta metodología puede ser combinada con otras técnicas para ampliar su espectro de medición, una de ellas son las perlas de captura para citometría, o más conocida como CBA<sup>22</sup>.

Evidencias sugieren que la calidad de las muestras de cordón umbilical para la obtención de células madre, se ve afectada por factores como la edad materna, la

edad gestacional, el sexo, el peso del recién nacido, la longitud del cordón umbilical y el peso de la placenta; las cuales pueden influir en el volumen, la cantidad de células mononucleares y la concentración celular de CD34+. En un estudio realizado por Chandra T et al<sup>23</sup>, no se encontró correlación de las CD34+ con el sexo de los bebés y el total de células nucleadas. Los bebés con peso normal al nacer tenían una mayor concentración de células CD34+. La concentración de células CD34+ y el recuento de TNC en la SCU, se asociaron con la edad gestacional. A pesar de que algunos autores han demostrado que la edad gestacional no está asociada con la concentración de células CD34+ derivadas de la SCU, los hallazgos no están en desacuerdo, ya que las poblaciones de células CD34+ pueden variar considerablemente con la hematopoyesis durante la gestación.

En el estudio realizado por Wan Z<sup>24</sup>, se menciona que la MEC proporciona un microambiente adecuado para el injerto, proliferación y diferenciación de células madre. La MEC producida principalmente por fibroblastos, es un componente clave del microambiente hepático. TIMP y MMP son dos enzimas que controlan la homeostasis de la MEC in vivo, adicionalmente, los cambios en la MEC pueden regular muchos aspectos del comportamiento celular, incluida la proliferación celular, el crecimiento y la supervivencia.

Kim et al<sup>25</sup>, realizaron una revisión para analizar las características fenotípicas, aplicaciones terapéuticas y la optimización de protocolos para obtención de células madre derivadas de gelatina de Wharton (WJ). Se menciona que las células madre mesenquimales, son una fuente de terapia para combatir diferentes enfermedades como: cáncer, enfermedades en el hígado, enfermedad cardiovascular, regeneración del cartílago, reparación de nervios periféricos, entre otras. Proviene de la gelatina de Wharton, que es una matriz rica en proteoglicanos mucosos, presente en el cordón umbilical.

Un grupo de investigación de la Universidad de Harvard, en el año 2014, encontró los efectos positivos que le brinda la sangre de ratones jóvenes a ratones ancianos, ayudando a la proliferación celular, a la neurogénesis y a la angiogénesis, además de mejorar el flujo sanguíneo, funciones que con el paso de la edad, van

decreciendo<sup>26</sup>. Haciendo uso de la parabiosis, técnica que se fundamenta en cruzar los sistemas circulatorios de dos ratones: uno viejo y uno joven en este caso; el estudio concluyó con el apoyo del uso de sangre joven para la revitalización; dando paso a nuevas investigaciones que concreten las posibles moléculas que estarían implicadas en este proceso<sup>27</sup>.

En el mismo año 2014, en Corea del Sur, Lee et al<sup>28</sup> dice que los TIMP son inhibidores endógenos de MMP-3, -8 y -9, quienes son importantes mediadores proinflamatorios en microglía activada. Se han logrado identificar 4 clases de TIMP, siendo TIMP -2 la de mayor expresión en el cuerpo<sup>12,26</sup>, se expresa por medio de células progenitoras neuronales, lo que resalta su importancia en la neurogénesis y en la protección de la muerte celular dopaminérgica. Lee y sus colaboradores demuestran que TIMP-2 se expresa en la microglia de ratones, y como esta expresión, puede ser inhibida por el tratamiento con lipopolisacáridos (LPS).

Posteriormente, Bequer et al<sup>28</sup>, mencionan que la sangre de cordón umbilical posee diferentes características bioquímicas que pueden afectar su calidad y también compara estas características con variables neonatales como edad gestacional y el peso al nacer, este estudio se relaciona mucho con la finalidad de Wen y colaboradores<sup>21,26</sup>

Moodley et al<sup>29</sup>, realizaron un estudio sobre la enfermedad de Alzheimer, la cual, es un trastorno neurodegenerativo que suele aparecer en la octava década de vida, con una pérdida de la memoria insidiosa y posterior culminación en demencia<sup>29</sup>. En el estudio de Lee y colaboradores<sup>27</sup> demostraron que TIMP-2 es capaz de incrementarse en enfermedades como esclerosis múltiple (EM), accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Huntington (HD), lo que sugiere que TIMP-2 cumple un papel protector en estas enfermedades. De esta forma, es posible usar la proteína en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos ya que es un importante regulador en la neuroinflamación<sup>27</sup>.

En el 2015, Al-Deghaither et al<sup>30</sup> realizaron un estudio donde se determinó el potencial hematopoyético en la sangre del cordón umbilical, y si esto tiene alguna implicación con variables maternas y/o neonatales encontrando que la edad de las maternas tuvo un efecto negativo en el recuento de células CD45+<sup>30</sup>, y el peso del recién nacido tuvo un efecto positivo en el conteo de células y viabilidad<sup>30</sup>. En ese mismo año, Rodríguez et al<sup>31</sup>, querían observar que variables neonatales y maternas afectaban el número de células nucleadas y células CD34+ en muestras de sangre de cordón umbilical. Se obtuvo un resultado parecido al estudio de Al-Deghaither y colaboradores<sup>30</sup>, adicionalmente encontraron positivo el conteo de células para el diámetro, longitud del cordón umbilical y el volumen de la muestra<sup>31</sup>.

En el 2015, Aguirre<sup>32</sup> habla sobre el hipocampo, su anatomía y fisiología, también de su función principal, la memoria, lesiones en el hipocampo conllevan a que los pacientes pierdan total funcionalidad de esta, a su vez, perdiendo la capacidad de generar memoria nueva. El envejecimiento es un problema que afecta al hipocampo, debido a un aumento de astrogliosis y microgliosis, alteraciones en la barrera hematoencefálica, disminución de la generación de neuronas y disminución de la función sináptica; siendo un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas<sup>33</sup>.

Se cree que el uso de sangre joven ayuda a revitalizar el hipocampo y sus funciones; para esto, se realizó un estudio en ratones viejos y jóvenes usando el método de parabiosis. Los resultados evidenciados fueron: Los pares heterogéneos, presentes en el músculo del ratón envejecido, exhiben niveles de regeneración juvenil después de una lesión. Después de realizado el estudio, las células aisladas del músculo de los parabiontes heterocrónicos envejecidos son más miogénicas y acumulan menos daño en el ADN que las contrapartes envejecidas<sup>33</sup>.

Una técnica muy usada para realizar la cuantificación de células o proteínas es la citometría de flujo, es un método eficaz, y tiene la capacidad de medir múltiples parámetros. El fundamento descrito en el libro publicado por García et al<sup>34</sup>, consiste

en hacer pasar células o partículas suspendidas en una solución, delante de un haz de luz; la emisión de luz es convertida en datos tangibles, que podrán ser transformados respectivamente en gráficas para poder ser leídos e interpretados. Las técnicas para la identificación y cuantificación de TIMP-2 son variadas, una de las conocidas es la ELISA, sin embargo, la citometría de flujo es más sensible y eficaz<sup>38</sup>, este método puede ser fusionado con otras técnicas para alcanzar una mayor sensibilidad y un amplio espectro de medición.

El cordón umbilical es un canal donde traspasan los nutrientes otorgados por la madre al feto, y la circulación para la obtención de oxígeno, Contreras et al<sup>35</sup> menciona que una gran parte de abortos espontáneos son debidos a problemas relacionados con el cordón umbilical, y variables como su longitud excesiva pueden estar relacionadas con consecuencias desfavorables<sup>35</sup>, este estudio también puede aportar a la mejor elección de sangre de cordón umbilical.

Como se mencionó en estudios anteriores, sobre la expresión de TIMP-2 en el hipocampo, lugar donde ayuda a la proliferación celular, es decir, a la neurogénesis<sup>12,27</sup>, cabe resaltar que según Olivares et al<sup>36</sup>, el giro dentado del hipocampo es el segundo lugar donde se lleva a cabo el proceso de neurogénesis del cerebro adulto<sup>35</sup>.

Un estudio realizado en Corea del Sur, en el año 2015 por Lee C et al<sup>37</sup>, revela la relación de la aparición de Displasia Broncopulmonar (DBP) con niveles bajos de TIMP-2. Se realizó el análisis de 4 moléculas MMP8, MMP9, TIMP-1 y TIMP-2 en 62 muestras de suero de recién nacidos usando una técnica enzimática (ELISA), el estudio introdujo entre su población recién nacidos prematuros con un promedio de 32 semanas de gestación y con un peso de menos de 1500 gr, se realizó un análisis entre recién nacidos con DBP, y otros sin la enfermedad, se manejaron variables clínicas del recién nacido como sexo, semanas de gestación, peso, etc. Se interpretó mediante un análisis de regresión logístico multivariante, que entre los

factores de riesgos para desarrollar DBP, el más prevalente fue en recién nacidos prematuros con niveles de TIMP-2 bajos.

En el 2017, el grupo de investigación de Castellano et al.<sup>39</sup> publicó un novedoso estudio el cual realizaron mediante microarrays y parabiosis principalmente, donde se evalúa nuevamente cómo la exposición a factores sanguíneos jóvenes puede revitalizar el hipocampo y mejorar la actividad sináptica. En el experimento usaron tres tipos de muestras: plasma humano, el de personas jóvenes y el de ancianos, y plasma de sangre de cordón umbilical, los ratones fueron tratados con estas tres muestras encontrando que aquellos tratados con plasma de sangre de cordón umbilical presentaban una mejoría en su memoria espacial, los tratados con plasmas jóvenes también tenían una mejoría pero no tan significativa, y los tratados con plasma de ancianos no tuvieron notable mejoría, esto se evidenciaba en las pruebas a las cuales eran sometidos los ratones para observar sus cambios frente a los tratamientos<sup>39</sup>.

Mediante los microarrays Castellano et al.<sup>39</sup> observaron cuáles eran las proteínas en el plasma de sangre de cordón umbilical que probablemente estarían implicadas en el rejuvenecimiento del hipocampo, encontrando tres principales: GAS6, CSF2 y TIMP-2, siendo TIMP-2 la más implicada en la revitalización, su comprobación se realizó suprimiendo a los ratones TIMP-2, modificando su gen de expresión, fueron sometidos a pruebas en laberintos donde recurrían a su memoria para salir, los ratones no superaron la prueba, es así como descubrieron la importancia de TIMP-2, siendo postulada como una proteína que podría ser usada en tratamientos para enfermedades neurodegenerativas, también se encontró que la concentración de TIMP-2 disminuye con el aumento de la edad<sup>39</sup>.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Fisiología y anatomía del Cordón umbilical

El cordón umbilical es un tejido, con estructura tubular y flexible, cubierto por un epitelio simple derivado del amnios denominado epitelio umbilical. Permite la unión directa entre el feto y la placenta e indirectamente con la madre. Aparece entre la semana 4 y 8 de gestación<sup>42</sup>, y va creciendo progresivamente hasta alcanzar una longitud promedio de 60 a 65 cm y un peso ideal de 40 gramos. Se encarga de transportar las sustancias esenciales requeridas por el feto para mantenerlo vivo y así mismo, lograr su crecimiento y desarrollo<sup>35,15</sup>.

Este tejido, se considera como una extensión del sistema cardiovascular fetal, ya que está compuesto por **dos arterias umbilicales**, que constan de capa elástica externa discontinua y se encargan del transporte de sangre desoxigenada; y **una vena umbilical**, que posee únicamente capa elástica interna y es la encargada de transportar sangre oxigenada<sup>35,25</sup>. Estos vasos sanguíneos, se encuentran inmersos en un tejido conectivo mucoso denominado gelatina de Wharton, la cual suple la función adventicia de los vasos y participa en la regulación del flujo sanguíneo; así como también lo hacen la longitud, el diámetro, calibre de vasos sanguíneos, entre otros<sup>35,41,15</sup>.

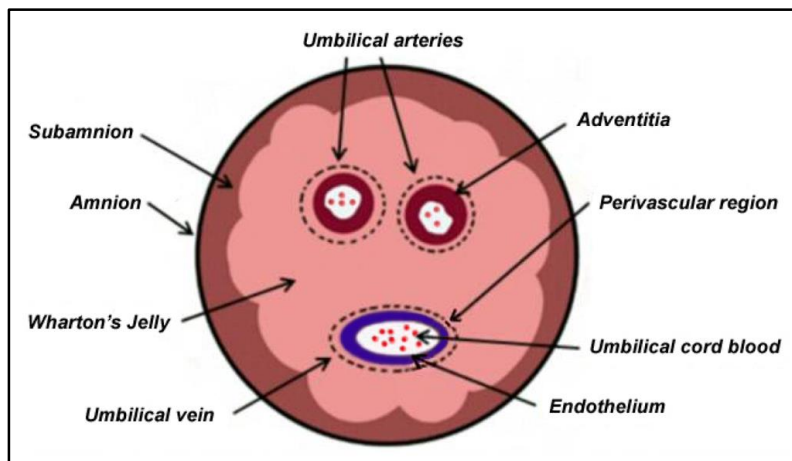


Figura 1. Partes del cordón umbilical

Modificada de Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing

La gelatina de Wharton, está compuesta de una matriz extracelular formada por fibras de colágeno donde se engloban los vasos sanguíneos del cordón; y proteoglicanos que le confieren a la matriz extracelular una mayor hidratación para proteger el cordón umbilical de presiones mecánicas. Por otro lado, contiene células estromales que contribuyen a la formación de fibras de colágeno y regulación en el flujo sanguíneo por tener propiedades contráctiles; poseen características de proliferación y diferenciación por lo cual, cumplen las características necesarias para ser consideradas células madre<sup>15</sup>. Finalmente es cubierta por el epitelio amniótico<sup>25</sup>.

#### **4.2. Sangre y plasma de sangre de Cordón Umbilical**

La sangre de cordón umbilical, es un parámetro poco analizado en la práctica clínica habitual, salvo en situaciones donde el recién nacido padezca algún tipo de patología o complicación y sea necesario un análisis químico. A pesar de esto, los análisis realizados a la sangre de cordón umbilical, han determinado que esta posee características tales como pH, concentración de gases y metabolitos que van ligadas fuertemente a la estructura del Cordón umbilical y permiten el desarrollo de la placenta y al intercambio de nutrientes y gases entre el feto y la madre, brindando una apropiada salud materna, fetal y neonatal; además de ser fuente de células madre hematopoyéticas, utilizadas para el tratamiento de leucemias, síndromes mielodisplásicos, anemias, inmunodeficiencias primarias y hemoglobinopatías<sup>30,31</sup>. Este hecho, permite que en la actualidad, la sangre de Cordón umbilical no se deseche como es usual, sino en cambio, sea considerada como una fuente terapéutica novedosa que puede ser investigada y almacenada.

El plasma de sangre de cordón umbilical no ha sido detenidamente investigado, los pocos estudios realizados mencionan algunas características encontradas, se ha observado la presencia de ARNm de citoquinas, factores proinflamatorios y restos de actividad metabólica<sup>19</sup>, por otra parte, un estudio realizado en el año



2017<sup>39</sup>, analizaron el plasma de sangre de cordón umbilical para observar si su analito en cuestión disminuía con el paso de la edad, corroborando su hipótesis de que TIMP-2 si lo hace, además que; según el estudio tiene un importante papel con el SNC, esto hizo que la sangre y plasma de sangre de cordón umbilical tuviera un nuevo enfoque como tratamiento ocasional<sup>39</sup>.

### **4.3. Generalidades y funciones de los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP)**

Las metaloproteinasas (MMP) son endopeptidasas que contienen Zinc y son dependientes de Calcio, están involucradas en la degradación de las macromoléculas presentes en la Matriz extracelular (MEC), su presencia está relacionada con el desarrollo celular y se mantienen bajo control debido a la combinación equilibrada que coexiste junto a los Inhibidores de las metaloproteinasas (TIMPs), también se cree que las moléculas de MEC podrían estar relacionadas con la plasticidad sináptica. Hasta el momento se han descrito cuatro tipos de TIMPs presentes en MEC: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, estructuralmente estas proteínas comparten doce residuos de cisteína que los caracteriza y les permite inhibir las MMP formando complejos selectivos con las formas activas de las metaloproteinasas<sup>12,4</sup>.

Se ha observado en diferentes estudios que los TIMPs se expresan no solo en humanos, también en otros mamíferos y en invertebrados, TIMP-1 es el más restringido en su rango de inhibición y su función fue expuesta en 1970 inhibiendo la colagenasa, ya en 1979 fue nombrada como TIMP, posteriormente se fueron describiendo los diferentes tipos de inhibidores, encontrando a TIMP-3 como el de mayor espectro de inhibición ya que no solo actúa en MMP, sino en la familia de las ADAM (desintegrina y metaloproteinasa A) y ADAMTS (desintegrina y la metaloproteinasa A con motivo de trombospondina) o también conocida como proteasa de escisión del factor de von Willebrand<sup>17, 53</sup>.

Los estudios han descrito a los inhibidores de metaloproteinasas como proteínas multifuncionales, que por diferentes vías de activación pueden desarrollar varias funciones como ayudar en el ciclo de la vida celular, en su crecimiento,

diferenciación y la muerte programada (apoptosis). Se ha encontrado que TIMP-1 y TIMP-2 están bastante relacionados con la plasticidad sináptica, esto pudo ser demostrado mediante experimentos realizados en ratones, quienes eran modificados resultando como TIMP-1 nulos o TIMP-2 nulos, los resultados concluyeron en que los dos inhibidores pueden estar desarrollando funciones importantes en áreas del sistema nervioso, como lo es el hipocampo donde la memoria y las actividades motoras se vieron afectadas con la ausencia de los inhibidores<sup>12,17</sup>.

#### **4.4 TIMP-2**

El inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2), es una proteína no glicosilada de 194 aminoácidos, que tiene un peso molecular entre 20 y 30 kD, siendo el inhibidor de metaloproteinasas de mayor expresión en el cuerpo<sup>12,27</sup>. Este inhibidor, desempeña un papel importante en la inactivación de las metaloproteinasas, permitiendo recuperar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la reparación de lesiones cerebrales; además de estar ampliamente implicado en la plasticidad neuronal<sup>3,12,27</sup>. Es posible encontrar esta proteína en órganos tales como: el pulmón, la piel, el cerebro, órganos reproductivos, en tejidos como la placenta, también en células de melanoma humano y en plasma de sangre de cordón umbilical humano<sup>3,12,39</sup>; en el cerebro su expresión es mediada por células progenitoras neuronales, implicándola en la neurogénesis y en la protección de la muerte celular programada<sup>27</sup>. Se cree que esta proteína es producida por las mismas células capaces de producir y sintetizar colagenasa intersticial<sup>2</sup>.

Esta proteína fue secuenciada y aislada por primera vez en 1989, e inicialmente se denominó CSC-21K, y se clasificó como una molécula similar a TIMP debido a su peso molecular y su secuencia de aminoácidos amino-terminal; por otro lado, se descubrió su capacidad de formar un complejo con procólagenasa tipo IV y así mismo, inhibir formas latentes y activas de colagenasa de tipo IV. Por ello, se denominó TIMP-2, nombre que se ha venido utilizando desde entonces para esta molécula<sup>2</sup>.

La colagenasa IV es una MMP (metaloproteinasa), presente en las membranas basales y secretada por células de melanoma humano<sup>1,2</sup>. Estudios en animales han demostrado que esta enzima se encuentra implicada en el desarrollo de la hemorragia intracerebral luego del trauma encefálico, produciendo necrosis de tejido. El papel de TIMP-2 en el control del desarrollo de la patología, consiste en inhibir la MMP, reparando el tejido necrosado. TIMP-2 también está implicado en el control de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica evitando el infarto cerebral<sup>3</sup>.

Es posible encontrar información de TIMP-2, donde se relata la importancia de esta proteína y su expresión en diversos tejidos; por ejemplo, se ha podido hallar la expresión de RNAm de TIMP-2 en pulmones, piel, órganos reproductivos y en cerebro; especialmente en la piamadre y el tejido neuronal<sup>3</sup>. Por otro lado, es posible identificar la expresión de TIMP-2 en el hipocampo; cumpliendo un rol importante en la plasticidad sináptica<sup>10</sup>. Así mismo, ha sido posible relacionar la disminución de esta proteína al aumento de la edad<sup>39</sup>.

#### **4.4.1. Estudios en modelo animal.**

En la actualidad, es posible encontrar varios estudios de TIMP-2 realizados en modelo animal como es el caso de los ratones; en los cuales se han estudiado las consecuencias de la expresión de TIMP-2, los roedores han desarrollado problemas relacionados con la pérdida de memoria, déficits motores, dificultades en la neurogénesis, complicaciones en el sistema nervioso central; entre otros<sup>12,17</sup>.

Recientemente, se demostró que los ratones de mayor edad, tenían una menor concentración de TIMP-2 en sangre; si estos ratones compartían sangre de ratones jóvenes mediante la parabiosis, TIMP-2 aumentaba, mejorando significativamente su memoria, neurogénesis y actividad sináptica, entre otras<sup>39</sup>. Esto despertó la curiosidad de los investigadores, llevando el estudio a experimentación en muestras humanas<sup>39</sup>. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de una

correlación inversa, que ocurre entre TIMP y el potencial invasivo que poseen las células tumorales murinas y humanas<sup>3</sup>.

Otras investigaciones realizadas en vertebrados no mamíferos como pollos y peces, demuestran la expresión de los cuatro TIMPs en estos animales, al igual que ocurre con los humanos; sin embargo, los cuatro TIMPs en estos animales son muy similares secuencialmente a TIMP-2<sup>17</sup>.

#### **4.4.2. Estudios en humanos**

Estudios realizados en humanos han demostrado el poder pronóstico de TIMP-2 en el desarrollo de meningioma y el crecimiento del tumor, debido a que los niveles de TIMP-2 se reducen significativamente en pacientes con meningioma avanzado<sup>45</sup>. TIMP-2 es importante en la revitalización del hipocampo, por lo que se postuló el uso de esta proteína como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas. Además, se evidenció, que el plasma de sangre de cordón umbilical contiene mayor cantidad de TIMP-2 que el plasma de sangre de individuos adultos, lo que comprueba que los niveles de TIMP-2 disminuyen al aumentar la edad<sup>39</sup>.

Por otro lado, se conoce la importancia de TIMP-2 en la remodelación de tejido conectivo posterior a tratamiento por filtración, muy utilizado en glaucomas, segunda causa de ceguera a nivel mundial; estudios demostraron la existencia de TIMP-2 alrededor del tejido conjuntivo de pacientes sometidos a cirugía de implante de drenaje de glaucoma<sup>40</sup>.

TIMP-2 es visto como el posible nuevo biomarcador candidato para el pronóstico en pacientes con cáncer gástrico, logrando expresarse en células cancerígenas, mesenquimales o inmunes; además de encontrarse en mayores niveles en cáncer gástrico que en tejidos no cancerosos; correlacionándose con el fenotipo maligno y el pronóstico desfavorable de los pacientes con cáncer<sup>48</sup>.

Según estudios realizados en Corea del sur, la displasia broncopulmonar en recién nacidos prematuros está asociada a niveles bajos de TIMP-2<sup>37</sup>

## **4.5. Técnicas utilizadas para la cuantificación de TIMP-2**

### **4.5.1 ELISA (Método enzimático).**

La técnica enzimática ELISA es una de las más utilizadas cotidianamente para la medición de diferentes analitos, hay varias modalidades como las directas e indirectas o tipo sándwich. El tipo sándwich es la más empleada para medir TIMP-2 en diferentes tipos de muestras, como el sobrenadante de cultivo celular, suero, plasma, plasma heparinizado y saliva<sup>49</sup>. Su duración es prolongada, con un promedio de 4.5 horas. El fundamento se evidencia en la reacción de una enzima con su sustrato específico donde se obtendrá un resultado que posteriormente será cuantificado por un lector de ELISA<sup>47</sup>.

El complejo formado para obtener la cuantificación es la unión de anticuerpos monoclonales dirigidos a TIMP-2, unos están en la fase sólida (placa), otros en el medio acuoso para así obtener el complejo sándwich, luego de este procedimiento el sustrato se unirá a la enzima conjugada en los anticuerpos monoclonales y posteriormente se obtendrá una reacción colorimétrica. La ELISA, como se mencionó anteriormente es muy usada, ya sea en clínica o investigación, esto es debido a sus precios más accesibles y a la facilidad de ejecutar el procedimiento, una de las desventajas es el tiempo en el cual se obtienen los resultados. En el caso del kit ofrecido por R&D SYSTEMS para la medición de TIMP-2, posee una sensibilidad de 0.064 ng / mL, y su especificidad se justifica en reconocer hasta el 50% de TIMP-2 recombinante complejo con MMP-9<sup>47</sup>.

### **4.5.2. Citometría de Flujo.**

La citometría de flujo es una técnica que permite medir y analizar características físicas de partículas individuales o células enteras, componentes celulares tales

como orgánulos, núcleos, ADN, ARN, cromosomas, citoquinas, hormonas y contenido de proteínas, que tengan un tamaño medio de 0.2 a 150 micrómetros<sup>6,38</sup>. Esta técnica es ampliamente utilizada en el área de hematología gracias a la sensibilidad y especificidad que posee<sup>34</sup>. Su fundamento consiste en medir la dispersión de la luz generada por una partícula o célula en cuestión, mientras van por una corriente fluida al frente de un láser con una longitud de onda específica, esta técnica logra resultados rápidos y confiables<sup>34, 38</sup>.

Las propiedades que se pueden medir por esta técnica incluyen el tamaño relativo de la partícula, la granularidad relativa o la complejidad interna celular y la intensidad de fluorescencia relativa<sup>6</sup>. La citometría de flujo puede ser combinada con varias técnicas para el análisis de estas propiedades, entre ellas está la inmunofluorescencia, en donde se usa un fluorocromo conjugado a un anticuerpo monoclonal específico contra el analito en cuestión, este complejo pasará al frente del láser, quien excitará el fluorocromo y este emitirá una onda de luz, esto será convertido por el sistema eléctrico del citómetro de flujo para así obtener datos tangibles de los eventos (cada complejo encontrado en la muestra analito-anticuerpo) presentados<sup>34</sup>.

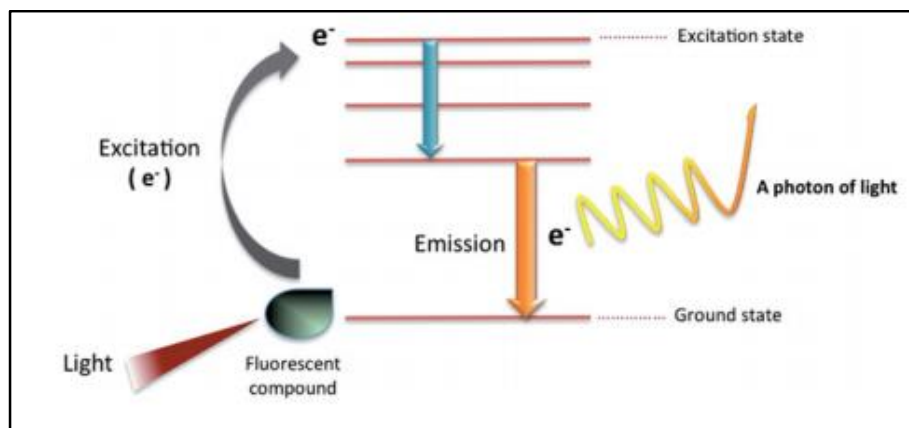


Figura 2. Generación de fluorescencia.

Modificada de *Flow cytometry: basic principles and applications. Critical Reviews in Biotechnology [Internet] 2016; Vol 37(2), 163–176. [Cited 10 Apr 2019]. Disponible en:*

<https://pdfs.semanticscholar.org/7e79/b4057a7a9f0cdaadca7c2dbb15e0e3c1b3cd.pdf>

Un citómetro de flujo está compuesto por tres sistemas: fluídica (o sistema de fluidos), óptica (excitación y colección) y electrónica (detectores). El sistema de fluidos se encarga de transportar las partículas a analizar por medio de un líquido, dirigiéndolas directamente a la fuente de luz. El sistema óptico, consta de dos láseres; la óptica de excitación, que enfoca la fuente de luz de las partículas y la óptica de colección, que transmite la dispersión de luz o la fluorescencia al sistema electrónico. Finalmente, el sistema electrónico, se encarga de detectar y convertir las señales de luz en datos proporcionales a la intensidad, que posteriormente serán procesados por un computador<sup>6,38</sup>.

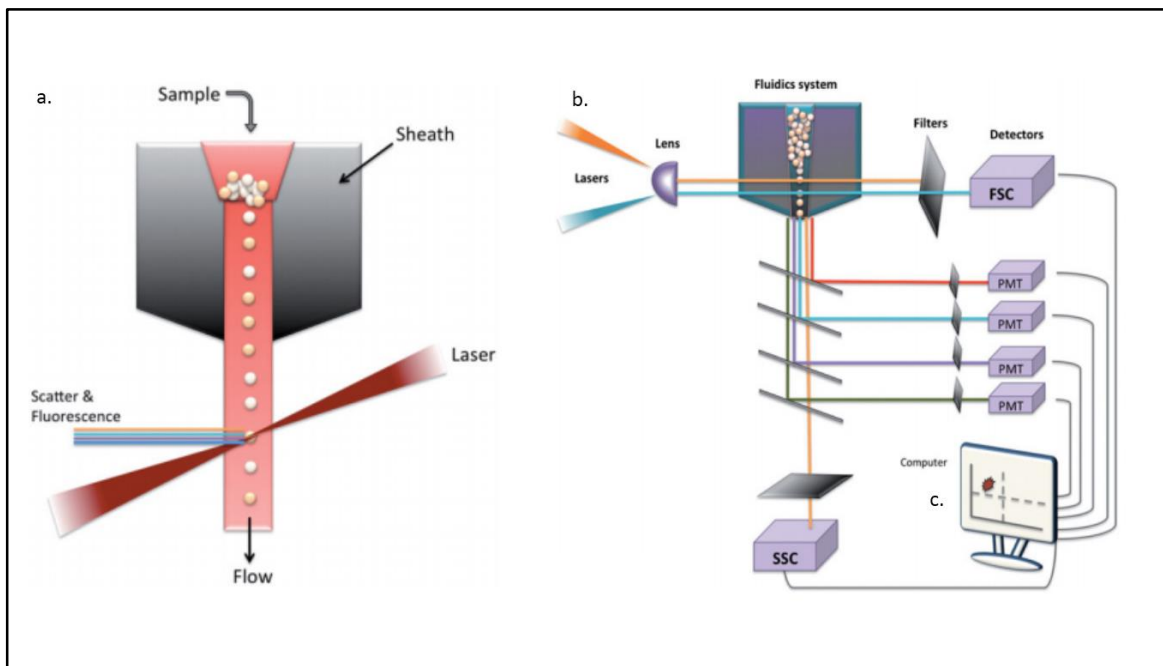


Figura 3. Composición general de los tres sistemas de un citómetro de flujo.

Modificada de *Flow cytometry: basic principles and applications. Critical Reviews in Biotechnology [Internet] 2016; Vol 37(2), 163–176. [Cited 10 Apr 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7e79/b4057a7a9f0cdaadca7c2dbb15e0e3c1b3cd.pdf>*

#### 4.5.3. Cytometric bead array CBA (perlas de captura citométricas).

El CBA es una técnica aplicable a citometría de flujo, basada en un inmunoensayo ELISA, la cual permite cuantificar múltiples proteínas simultáneamente tales como: mediadores inflamatorios, quimiocinas, isotipos de inmunoglobulina, moléculas de

señalización intracelular, mediadores apoptóticos, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, proteínas de señalización celular fosforiladas. y anticuerpos<sup>52</sup>.

El sistema BD™ Cytometric Bead Array (CBA) de Becton Dickinson®, permite capturar analitos utilizando perlas de diferentes colores y tamaños recubiertas con anticuerpos de detección con emisión específica en longitud de onda, y el rango fluorescencia emitida, medida mediante una señal fluorescente, para lo cual, se utiliza la citometría de flujo. Esta medida, será proporcional a la concentración del analito en cuestión, presente en la muestra<sup>21,52</sup>. Cada perla posee una intensidad de fluorescencia única, lo que le permite identificar analitos específicos; de modo tal, que las perlas pueden ser mezcladas y analizadas simultáneamente en un solo tubo, lo que permite reducir el tiempo de análisis permitiendo hallar múltiples analitos con precisión y consistencia, dentro de una muestra dada de tan solo 25 a 50  $\mu\text{L}$ <sup>21,10</sup>. Otras técnicas tradicionales como ELISA y Western blot, solamente permiten analizar una proteína en la misma cantidad de volumen en un tiempo mayor comparado con el CBA<sup>21</sup>.

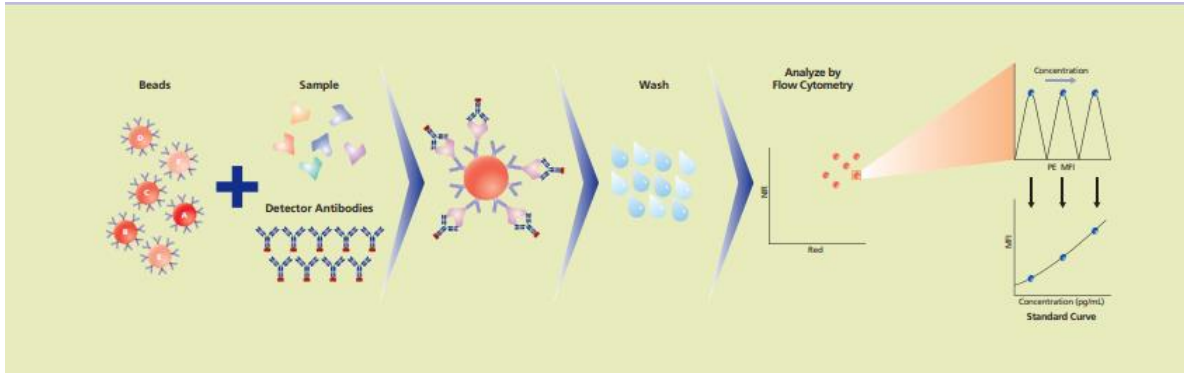


Figura 4. Procedimiento perlas de captura.

Modificada de *low cytometry: basic principles and applications. Critical Reviews in Biotechnology [Internet] 2016; Vol 37(2), 163–176. [Cited 10 Apr 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7e79/b4057a7a9f0cdaadca7c2dbb15e0e3c1b3cd.pdf>*



#### **4.6. Fisiología y anatomía del Hipocampo**

El hipocampo deriva de la formación hipocampal, forma parte del sistema límbico y juega un papel importante en el aprendizaje espacial y la memoria a largo y corto plazo. La formación hipocampal consta de tres partes: el giro o circunvolución dentada, el subiculum y el cuerpo de Amón o hipocampo propio. Este último, se divide en tres áreas (CA1, CA2 y CA3) las cuales forman un microcircuito trisináptico neuronal conectado a través de fibras y células piramidales, donde CA3 proyecta sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de CA1 y hacia todo el hipocampo mediante proyecciones comisurales. Este circuito se encarga del procesamiento de la memoria<sup>32,36</sup> la cual se divide en memoria a corto plazo y memoria a largo plazo; y a su vez se clasifica en memoria declarativa, encargada de almacenar hechos o sucesos que requieren ser recordados de manera explícita; y la memoria espacial, que se encarga de almacenar información en el marco espacio-tiempo<sup>32</sup>.

El hipocampo, también es importante en la neurogénesis, que hace referencia a la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de nuevas células. Esta ocurre por lo general en el giro dentado del hipocampo e implica a células troncales y progenitores neurales que dan lugar a las neuronas, glía y oligodendrocitos. La neurogénesis juega un papel importante en el incremento del aprendizaje espacial, y el aprendizaje espacial permite incrementar la neurogénesis, favoreciendo la supervivencia de las nuevas células<sup>36</sup>.

Varios estudios permiten relacionar la pérdida de funcionalidad en el hipocampo, a la vejez, debido a alteraciones en la barrera hematoencefálica, disminución de la neurogénesis y de la función sináptica; implicándolo así en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer<sup>29, 39</sup>.

#### **4.7. Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (EA), fue descubierta por primera vez en el año 1906 por el Dr. Alois Alzheimer. Se define como una enfermedad neurodegenerativa que por lo general, suele aparecer en la octava década de la vida; afectando

principalmente al hipocampo y causando lesiones neuropatológicas en muchas regiones del cerebro; trayendo consecuencias tales como la pérdida de memoria insidiosa, deficiencias cognitivas, cambios en el comportamiento y personalidad, y posterior culminación en demencia; siendo uno de los tipos de demencia más comúnmente diagnosticados<sup>29, 51</sup>.

Por lo general, los síntomas clínicos de la AD se desarrollan lentamente, empeoran con el tiempo y van acompañados de una mayor necesidad, generando así un mayor impacto social y económico para los sistemas de salud, pues esta, afecta su funcionalidad, y disminuye la calidad de vida de las personas que la padecen<sup>18, 51</sup>. A Través de los años, se han relacionado múltiples factores de riesgo a la aparición de esta enfermedad, incluidos sexo, genética, estilo de vida, edad avanzada y finalmente, antecedentes familiares<sup>29,51</sup>.

Se ha estimado una prevalencia global de la enfermedad de Alzheimer en 44 millones de personas y es posible prever que esta enfermedad sea capaz de duplicarse cada 20 años, por lo tanto, se espera que el número de personas afectadas, alcance los 74.4 millones para el 2030 y 131.5 millones en 2050<sup>51</sup>. En Colombia, se tienen datos donde se evidencia una prevalencia de EA del 1.8 y 3.4% en grupos de pacientes mayores a 65 y 75 años respectivamente. En Europa, se estima que alrededor de 850.000 casos de EA son diagnosticados, y anualmente, se reportan cerca de 220.000 casos nuevos<sup>18</sup>.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Clasificación del diseño de investigación

Este estudio es de tipo observacional descriptivo de corte transversal con componente analítico.

### 5.2. Población

Neonatos colombianos.

### 5.3. Selección y tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra para el estudio fue de 60 plasmas de sangre de cordón umbilical, con un tamaño estimado de 56 muestras.

### 5.4. Criterios de inclusión y de exclusión

Tabla 1. *Criterios de inclusión y de exclusión para la selección de muestras.*

Elaboración propia

<b>Criterios de inclusión</b>	<b>Criterios de exclusión.</b>
Recién nacidos sanos que no presentaron complicaciones al nacer.	Recién nacidos prematuros.
Recuento de células nucleadas mayor a 400 millones en las muestras recolectadas.	Plasmas con pruebas infecciosas positivas.
Volumen de muestra mínimo 40 mL de sangre.	Plasmas con pruebas microbiológicas positivas.
Tiempo entre la recolección y el procesamiento inicial menor a 36 horas.	No firma del consentimiento informado
Tener crio preservadas las muestras de plasma de SCU en STEM Medicina Regenerativa.	Muestras con datos del recién nacido y de madre incompletos

## **5.5. Variables**

### **5.5.1. Variables neonatales y perinatales.**

La definición general de variable es, aquel factor que puede cambiar o variar según las circunstancias dadas, es el mismo caso para las variables neonatales. La palabra “neonatal” hace referencia al periodo gestacional comprendido entre el día del nacimiento hasta los primeros 28 días, también existen periodos anteriores al neonatal, como el perinatal, que comienza a partir de la semana 22 de gestación y termina hasta los siete primeros días de vida del neonato<sup>16</sup>.

Se han realizado numerosas investigaciones con variables neonatales y perinatales, y sus posibles relaciones con otros factores, como la celularidad y características bioquímicas en sangre de cordón umbilical, con la finalidad de mejorar los criterios de inclusión o exclusión en Bancos de sangre de cordón umbilical<sup>28,30,31</sup>. Existen distintas variables perinatales, las más usadas por los investigadores son: *edad gestacional*, y es definida como el tiempo de gestación contado desde el primer día del último período menstrual hasta el día del parto y se mide en días o semanas<sup>16</sup>, también está el peso, talla, tipo de parto, sexo<sup>30</sup>.

### **5.5.2. Variables dependientes.**

Expresión de TIMP-2 en los plasmas de cordón umbilical.

### **5.5.3. Variables independientes.**

Las características neonatales como peso, talla, edad gestacional, tipo de parto, género, volumen de muestra obtenida, recuento de células nucleadas y recuento de CD34+.

Tabla 2. *Definición de las variables.*

Elaboración propia

<b>Variables cualitativas</b>	
Sexo	Características externas de los genitales
Vía de parto	Vía por la cual se dió el nacimiento
<b>Variables cuantitativas</b>	
Semanas de gestación	Número de semanas desde el inicio de la gestación hasta el momento del parto
Peso (gr)	Masa corporal del neonato medida en gramos
Volumen (ml)	cantidad de muestra obtenida medida en mililitros (ml)
Recuento células nucleadas (CN) $10^3/\mu\text{l}$	Conteo de células nucleadas en la muestra obtenida
CD34+/ $\mu\text{L}$	Conteo de células CD34+ en la muestra obtenida por microlitro ( $\mu\text{L}$ )
TIMP-2 ng/ml	Concentración de la proteína TIMP-2 en cada muestra analizada (ng/ml)

## 5.6. Obtención y procesamiento de muestras

Se realizó la firma de los consentimientos de pacientes que acudieron a STEM Medicina regenerativa para criopreservar la sangre de cordón umbilical y que quisieron donar una alícuota de plasma para ser partícipes de este proyecto. Las muestras se obtuvieron por punción de la vena del cordón umbilical en bolsa transfer con 35mL de anticoagulante CPDA-1, por personal capacitado al momento del nacimiento del neonato. El volumen promedio recolectado por bolsa fue de 70 a 140mL aproximadamente. En el laboratorio de STEM Medicina Regenerativa, procesaron las muestras con protocolos estandarizados para la obtención de los componentes sanguíneos. Se criopreservó y almacenó el plasma de sangre de cordón umbilical y una alícuota para la determinación de TIMP-2 a -80°C hasta su uso. Se realizaron las pruebas infecciosas y microbiológicas de cada plasma y se procedió a realizar la base de datos con muestras que cumplieran los criterios de inclusión y de exclusión y que tuvieran datos completos.

## 5.7. Determinación de TIMP-2.

Se hizo uso del **Kit LEGENDplex™ Human TIMP Mix and Match**<sup>54</sup> (Figura 6), que tiene como principio el uso de perlas recubiertas de anticuerpos monoclonales (específicos contra un analito) a los cuales el analito problema se une, luego se añade un anticuerpo monoclonal biotinilado para formar un complejo tipo sandwich, finalmente se agrega Estreptavidina-ficoeritrina (PE), la cual se adhiere al complejo inmune y es leído mediante fluorescencia en el equipo de la compañía Becton Dickinson® (BD) FACScanto II; el cual posee dos láser, uno rojo con una longitud de onda entre 633 a 635 nm y uno azul de 488 nm.

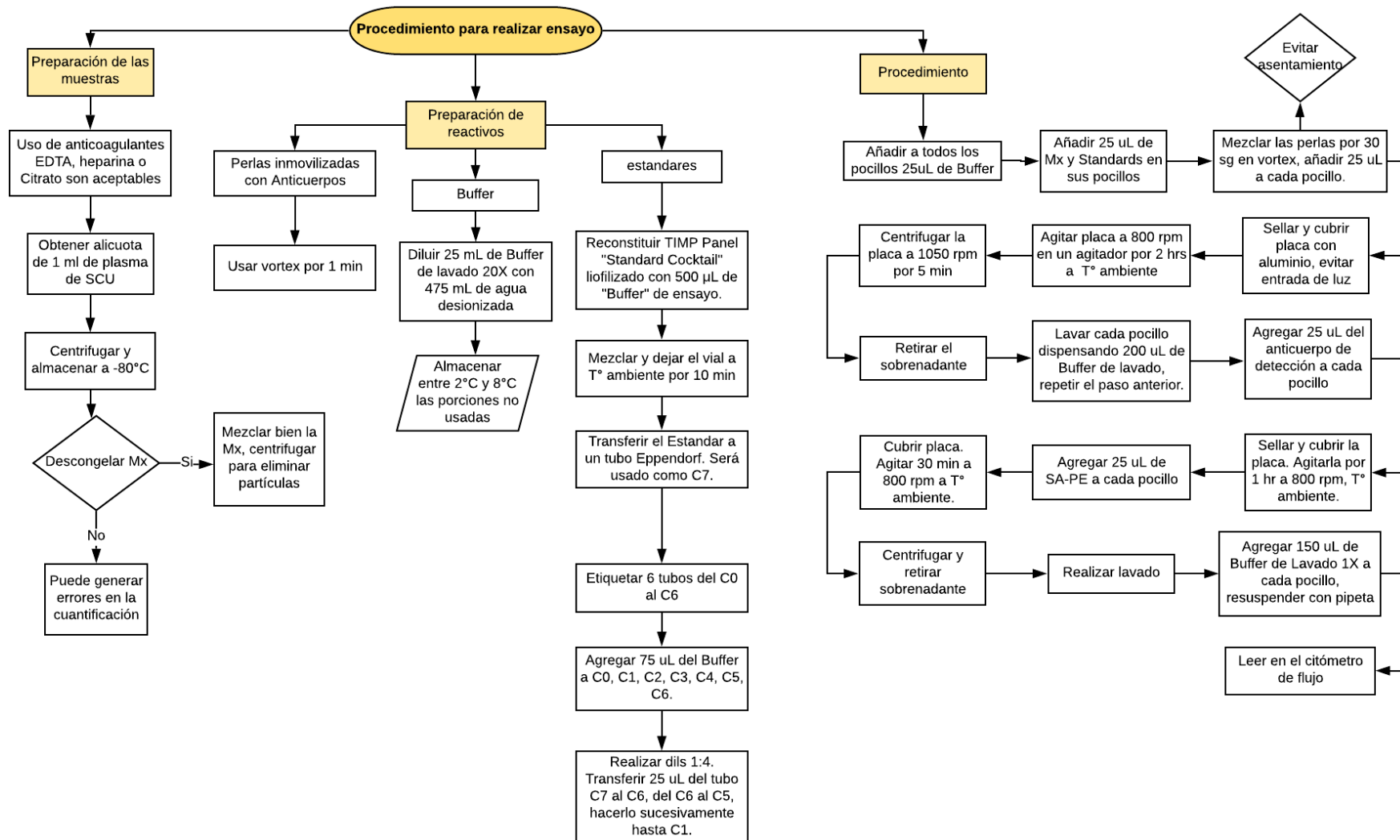


Figura 5. Protocolo de procesamiento del Kit LEGENDplex™ Human TIMP Mix and Match<sup>54</sup>  
Elaboración propia.

## **6. PLAN DE ANÁLISIS**

### **6.1 Análisis de datos**

El archivo FCS generado por el citómetro de flujo se analizó utilizando el software de análisis de datos LEGENDplex™ de BioLegend®.

### **6.2 Análisis estadístico**

Para las variables continuas, se realizaron estadísticas descriptivas que incluyen media, desviación estándar, mediana, mínima y máxima para los indicadores de calidad de las unidades celulares de sangre de cordón umbilical. Las variables categóricas se describieron en Porcentajes. Se realizaron pruebas de normalidad de shapiro-wilk y se utilizó el coeficiente correlación de rango de Spearman para cuantificar las asociaciones bivariadas entre los indicadores de calidad de las unidades celulares de sangre de cordón y los factores obstétricos y neonatales. Se adoptó un nivel de significación de 0.05 para todos los análisis. Todos los resultados del análisis de correlación se obtuvieron en el programa estadístico STATA versión 12 del Hospital Militar Central de Bogotá.



## 7. RESULTADOS

La edad gestacional promedio fue de 38.18 semanas (varió de 33 a 40 semanas), y el peso promedio al nacer fue de 3152.13 g (varió de 1520 g a 4800 g). Entre los recién nacidos, 50% eran hombres. En el tipo de parto, el vaginal fue del 16,57% y el 83,3% fue por cesárea. El número promedio de TIMP-2 fue de 97.73 pg/ml con un rango de 17.9 a 376.8 pg/ml; el promedio de CD34 + fue de 97.14 / ul, con un rango de 9.4 a 403.8 / ul. El número medio de CN fue de 9.07 ul (con un rango de 4.3 / ul a 20.5 / ul) y el volumen promedio de sangre de cordón fue de 101.26 ml (con un rango de 73 ml a 139 ml) (Tabla 3).

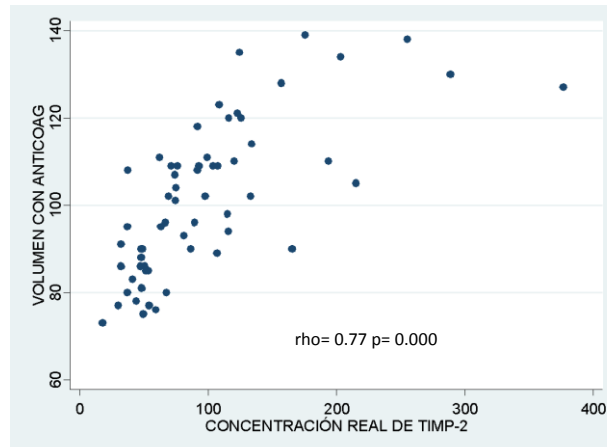
Tabla 3. *Características de 60 unidades de plasma de sangre de cordón umbilical y de los donantes. Elaboración propia.*

<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>SD*</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Talla (cm)</b>	49.11	2.79	49	34	46
<b>Peso al nacer (g)</b>	3152.13	482.06	3129	1520	4800
<b>Periodo gestacional (semana)</b>	38.18	1.17	38	33	40
<b>Volumen (mL)</b>	101.26	66.84	101.5	73	139
<b>CD34+ (uL)</b>	97.14	74.53	76.95	9.24	403.81
<b>Recuento CN (103/ul)</b>	09.07	3.11	8.65	4.3	20.5
<b>TIMP-2 (ng/ml)</b>	97.73	66.84	78.5	17.9	376.8
<b>Sexo</b>	<b>n (%)</b>				
<b>Masculino</b>	30 (50)				
<b>Femenino</b>	30 (50)				
<b>Vía de Parto</b>					
<b>Cesárea</b>	50 (83.3)				
<b>Parto Vaginal</b>	10 (16.57)				

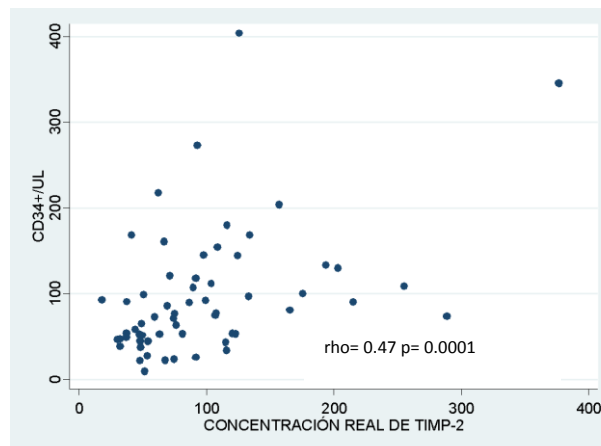
\*SD: desviación estándar

Se evaluaron las correlaciones por pares y se encontró que el volumen se asoció positivamente con el número de células de TIMP-2 (Spearman's rho = 0.77, 95% IC: 0.64 a 0.85), El recuento de CN con el TIMP-2 Spearman's rho = 0.36, 95% CI: 0.11

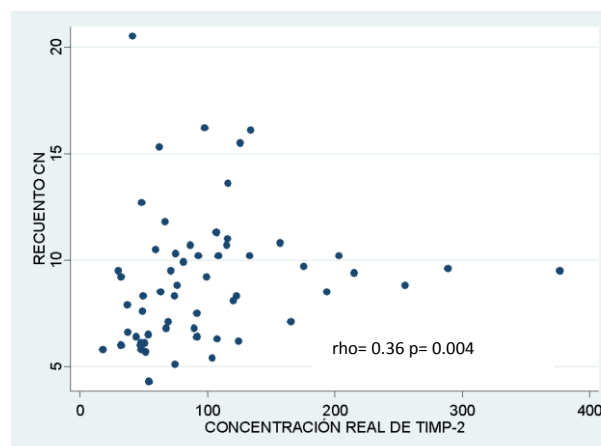
a 0.56); el CD34 y TIMP-2 Spearman's rho = 0.472, 95% CI: 0.248 a 0.648). (Figura 6).



a



b



c

Figura 6. Variables correlacionadas con el contenido de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical

Correlaciones entre el contenido de sangre del cordón umbilical ( $n = 60$ ). Se observaron correlaciones positivas significativas entre (a) volumen y TIMP-2  $\rho = 0.77$ ; (b) CD34 y TIMP-2  $\rho = 0.47$ ; (c) Recuento de CN y TIMP-2  $\rho = 0.36$

El resto de las correlaciones se resumen en la (Tabla 4). No hubo asociaciones significativas entre las semanas de gestación, y el peso con la presencia de TIMP-2, ni con ninguna otra variable.

Tabla 4. *Correlaciones entre factores neonatales y el contenido de sangre de cordón umbilical. Elaboración propia.*

	Volumen rho(p)	Recuento CN rho(p)	CD34+ (uL) rho(p)	Peso rho(p)	Edad gestacional rho(p)	Sexo rho(p)	Vía de parto rho(p)
<b>TIMP-2 (pg/mL)</b>	<b>0.77 (0.000)</b>	<b>0.36 (0.004)</b>	<b>0.47 (0.0001)</b>	0.30 (0.019)	0.05 (0.68)	0.05 (0.66)	0.01 (0.93)
<b>CD34+ (uL)</b>	<b>0.59 (0.0000)</b>	<b>0.48 (0.0001)</b>	1	0.38 (0.0026)	0.02 (0.87)	0.11 (0.37)	0.13 (0.29)
<b>Recuento CN</b>	<b>0.29 (0.024)</b>	1	<b>0.34 (0.007)</b>	0.31 (0.015)	0.10 (0.44)	0.13 (0.28)	0.02 (0.82)

Tabla 5. Comportamiento de TIMP-2 con respecto a los intervalos de las Variables estudiadas. Elaboración propia.

VARIABLES	INTERVALOS	Frecuencia	MEDIA	TIMP-2
Volumen (ml)	73 - 83	10	44,9	↓ (17,9)
	83,1 - 93	12	64,1	↓↑(106.8, 165.5)
	93,1 - 103	11	93,8	↑
	103,1 - 113	14	101,4	↑ (215,4)
	113,1 - 123	5	117,9	↑
	123,1 - 133	3	232,7	↑↑ (376,8)
Parto	133,1 - 143	4	189,6	↑↑
	Cesárea	50	97,0	↓↑
Peso (gr)	Parto Natural	10	100,2	↓↑
	1501 - 2500	3	69,7	↓
	2501 - 3500	47	110,6	↑
Sexo	3501 - 4500	10	80,65	↓
	Femenino	30	93,26	↓↑
Semanas de gestación	Masculino	30	100,2	↓↑
	<36	2	34,2	↓
	36-38	20	105,7	↑↑
Talla (cm)	38,1-40	38	105,5	↑↓
	30 - 40	1	86,6	↓↑
	40,1 - 50	44	100,3	↑
CD34+ (uL)	> 50	15	90,8	↓↑
	9-69	25	63,5	↓
	69.1-129.1	21	113,0	↑
	129,2-189,2	9	120,6	↑↑
	189,3-249,3	2	119,0	↑
	249,4-309,4	1	92,4	↓↑
	309,5-369,5	1	376,8	↑↑ (376,8)
Recuento CN (10 <sup>3</sup> /ul)	369,6-429,6	1	255,1	↑↑
	4-6,9	18	63,5	↓
	7-9,9	23	150,4	↑↑
	10-12,9	13	105,2	↑
	13-15,9	3	101,2	↑
	16-18,9	2	115,2	↑
	19-21,9	1	41,05	↓

\* ↑ = Alto, ↑↑ = Muy alto, ↑↓ = Medio, ↓ = Bajo

Se ubicaron las variables cuantitativas en intervalos, y en cada uno de ellos se observó el comportamiento general de las concentraciones de TIMP-2 encontradas, encontrando que en los últimos intervalos del volumen (123,1 - 133 ml) (133 - 143,1

ml) las concentraciones más altas de TIMP-2, esto mismo se evidenció en CD34+, observando mayores concentraciones en los últimos intervalos (309,5 - 369,5/ul).

En las CN las concentraciones más altas se encontraron en el segundo intervalo ( $7 - 9,9 \times 10^3$ /ul), y en el intervalo mayor ( $19 - 21,9 \times 10^3$ /ul) se encontraron concentraciones bajas de TIMP-2.

## 8. DISCUSIÓN

Actualmente, los estudios en sangre de cordón umbilical han tomado gran importancia en la comunidad científica debido a los varios blancos terapéuticos que alberga este tejido, entre ellos está el realizado por los investigadores de la Universidad de Stanford en el 2017<sup>39</sup>. Otros estudios demuestran el potencial terapéutico de la sangre de cordón umbilical, siendo fuente de progenitores hematopoyéticos, utilizados en el tratamiento de enfermedades degenerativas, así como padecimientos de tipo autoinmune y hematológico<sup>50</sup>. Por otro lado, como se ha mencionado a lo largo del estudio, la proteína TIMP-2 es importante en la revitalización del hipocampo, pero también, ha sido posible relacionar su disminución a la aparición de diferentes patologías; incluso se ha llegado a considerar a este inhibidor como biomarcador candidato para el pronóstico en pacientes con cáncer gástrico<sup>48</sup>. El presente estudio se dedicó a encontrar variables neonatales que se correlacionaran con la concentración de TIMP-2 en los plasmas de sangre de cordón umbilical. En los resultados obtenidos usando el análisis estadístico de correlación, se encontró que las variables independientes continuas como el volumen, conteo de CD34+ y CN tuvieron un coeficiente de correlación cercano a 1, es decir, que su correlación con la concentración de TIMP-2 es significativa (Tabla 4).

Como es bien sabido, el cordón umbilical es una importante fuente de células madre hematopoyéticas o CD34+, las cuales se encuentran en mayor o en menor medida en cada una de las muestras analizadas en este estudio. Además de los beneficios que traen para la salud, estudios demuestran que estas células secretan constitutivamente TIMP-1 y TIMP-2<sup>7</sup>, dejando como evidencia aquella correlación moderada de la presencia de TIMP-2 con estas células, como se puede observar en la Figura 7b, y en la Tabla 4. Se esperaba que la correlación de TIMP-2 con CD34 fuera alta, debido a la evidencia científica que señala que CD34+ sintetiza TIMP-2<sup>7</sup>. Es importante tener en cuenta que estos datos fueron obtenidos de pacientes adultos, y nuestra población de estudio es de recién nacidos, además TIMP-2 está relacionada con la remodelación de la membrana amniótica por lo cual,

es posible que los niveles de TIMP-2 no solo dependan de la producción de CD34+, sino de otras células o tejidos fetales<sup>9</sup>.

El aumento de volumen se correlaciona con niveles de celularidad más altos<sup>20, 11</sup>, ya sea CD34+ y CN, se puede observar que en la Tabla 4 fue la variable que mayor correlación presentó con TIMP-2, encontrando una agrupación de datos significativa con una linealidad ascendente en la figura 7a, al conocer que las CD34+ son las secretoras de TIMP-2, podemos decir que el volumen es una variable importante a la hora de tener en cuenta para la cuantificación de esta proteína<sup>8</sup>.

El recuento de CN presentó una correlación moderada (Tabla 4), encontrando en la Figura 7c una mayor dispersión de los resultados, además de lo observado, la Tabla 5 demuestra que el comportamiento de TIMP-2 fue mayor en recuentos de CN menores, contrariamente a los recuentos mayores donde se encontró menor concentración de TIMP-2. Se esperaba que hubiera una correlación alta, y un comportamiento ideal donde la mayor concentración de TIMP-2 se encontraría en recuentos mayores de CN, debido a la evidencia científica, que sustenta a las células progenitoras hematopoyéticas como secretoras de TIMP-2<sup>7</sup>; además, esto puede servir como soporte de que el TIMP-2 puede ser producido por otros tejidos fetales como la placenta<sup>9</sup>.

En esta investigación no se evidenció correlación de TIMP-2 con el peso de los recién nacidos (Tabla 4), sin embargo su relación con un conteo mayor de células hematopoyéticas inmaduras<sup>11</sup>, ayuda a inferir que es una variable que debería ser tomada en cuenta entre los parámetros para seleccionar un donante de sangre de cordón con la finalidad de encontrar concentraciones elevadas de TIMP-2; otros estudios han demostrado que recién nacidos con pesos normales o aumentados, tienen la capacidad de proporcionar un mayor volumen de sangre de cordón umbilical<sup>8</sup>, esto es importante debido a la correlación positiva encontrada entre el volumen de plasma de sangre de cordón umbilical y la concentración de TIMP-2.

VARIABLES COMO LA EDAD GESTACIONAL Y EL SEXO DEL RECIÉN NACIDO, PUEDEN INFLUIR EN LA OBTENCIÓN DE VOLUMEN Y DE CÉLULAS NUCLEADAS<sup>23</sup>, A PESAR DE ES, OTRAS INVESTIGACIONES NO HAN ENCONTRADO RELACIÓN ALGUNA CON LAS VARIABLES ANTERIORMENTE MENCIONADAS<sup>20</sup>; ESTA DISCREPANCIA PUEDE DEBERSE A QUE LAS POBLACIONES DE CD34+ VARÍAN CONSIDERABLEMENTE CON LA HEMATOPYESIS DURANTE EL PERIODO DE GESTACIÓN <sup>23</sup>, DURANTE LA TRANSICIÓN DE LA HEMATOPYESIS HEPÁTICA A LA DE LA MÉDULA ÓSEA<sup>5</sup>; EN EL PRESENTE ESTUDIO NO SE ENCONTRÓ INFLUENCIA DE ESTAS VARIABLES SOBRE EL TIMP-2. ANTERIORMENTE SE HA MENCIONADO LA IMPORTANCIA DE TIMP-2 EN EL MANTENIMIENTO DE LA MEC, CREANDO UN MICROAMBIENTE APROPIADO PARA EL FUNCIONAMIENTO CELULAR, DONDE SE INCLUYE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE CD34+<sup>24</sup>, ESTO PUEDE CONFIRMAR Y JUSTIFICAR LA CORRELACIÓN ENCONTRADA ENTRE TIMP-2 Y LAS CÉLULAS CD34+.

CABE RESALTAR LA EXISTENCIA DE OTRAS VARIABLES O FACTORES; QUE AUNQUE NO SE TOMARON EN CUENTA PARA ESTA INVESTIGACIÓN, EN OTROS ESTUDIOS HAN ENCONTRADO RELACIÓN ALGUNA CON LA CONCENTRACIÓN DE TIMP-2, EL NACIMIENTO PREMATURO ES UNA DE ELLAS<sup>43</sup>, SE HA ENCONTRADO QUE EN NEONATOS NACIDOS ANTES DE TÉRMINO LOS NIVELES DE TIMP-2 SON MENORES, CONTRARIO A LOS NACIDO A TÉRMINO; LA CAUSA DE ESTE COMPORTAMIENTO ES LA ACTIVIDAD COMBINADA DE LAS METALOPROTEINASAS JUNTO A SUS INHIBIDORES, MMP-2/TIMP-2, YA QUE SE HA ENCONTRADO QUE MMP-2 AUMENTA EN MUJERES EMBARAZADAS CON PARTO PREMATURO<sup>43</sup>, RELACIONÁNDOSE DE IGUAL MANERA CON LA DEGRADACIÓN DE LA MEC, LO CUAL CONDUCE A LA DEGRADACIÓN DE LAS MEMBRANAS AMNIO Y CORION, ATRIBUYÉNDOSE A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXCESIVA DE LAS GELATINASA MMP-2, HALLANDO UN Desequilibrio entre las concentraciones de MMP-2 y TIMP-2 en líquido amniótico o el moco endocervical durante el embarazo de mujeres que tuvieron a sus hijos prematuros. Adicionalmente, se ha relacionado la baja concentración de TIMP-2 con la infección intrauterina, debido a que las endotoxinas bacterianas disminuyen la síntesis de proteínas de TIMP-2<sup>13,9</sup>.

HASTA EL MOMENTO NO HAY UN ESTUDIO QUE DETERMINE LOS VALORES DE REFERENCIA OFICIALES DE TIMP-2 EN PLASMA DE SCU, POR ESA RAZÓN, SE HIZO USO DE LOS VALORES DE REFERENCIA DEL INSERTO DEL KIT LEGENDplex™ HUMAN TIMP Mix and Match<sup>54</sup>, TIMP-2 EN PLASMA CITRATADO DE ADULTOS: 12.8 - 26.4 ng/ml. EN ESTE ESTUDIO EL VALOR MÍNIMO DE TIMP-2 (ng/mL) FUE DE 17,9 Y EL MÁS ALTO FUE DE 376,8 (Tabla 3), LA MEDIANA FUE DE 78.5. SE ENCONTRÓ QUE UNA GRAN PARTE DE LOS VALORES DE TIMP-2



cuantificados en el plasma están elevados comparándolos contra el intervalo de referencia en adultos, dando a entender que la sangre de cordón umbilical posee una concentración más alta de TIMP-2, posiblemente, relacionando la edad con la concentración, ya que la concentración de TIMP-2 disminuye progresivamente al aumentar la edad<sup>39</sup>

## 9. CONCLUSIONES

Durante la investigación, no se encontró un intervalo de referencia de la concentración de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical, se hizo uso del encontrado en el inserto del Kit usado para el análisis<sup>54</sup>, 12,8 a 26,4 ng/ml son los valores normales en plasmas de adultos, encontrando que más del 90% de las muestras analizadas superó significativamente ese intervalo, y el rango obtenido en las muestras analizadas fue entre 17,9 a 376,8 ng/ml.

Se pudo concluir que la concentración de TIMP-2 se encuentra correlacionada con características neonatales (Volumen, CD34+, CNT); siendo estas, variables de calidad que se deben tener en cuenta a la hora de obtener una muestra de plasma de sangre de cordón umbilical rica en TIMP-2.

El estudio brinda nuevos conocimientos sobre TIMP-2, sobre su concentración en plasma de SCU, además propone que los niveles del TIMP-2 en plasma de SCU pueden depender no solo de la producción por parte las CD34+, sino de otras células o tejidos fetales. Sin embargo es importante realizar otros estudios que soporten esta hipótesis.

Los hallazgos de este estudio brindan a la comunidad científica conocimiento sobre TIMP-2 con el fin de usarla en el futuro como fuente de tratamiento para las enfermedades neurodegenerativas.

## 10. ASPECTOS ÉTICOS

Durante la realización de la investigación se siguieron las normas éticas actuales según la resolución N° 008430 de 1993 del ministerio de Salud y la ley 84 de 1989, en donde se identifica el estudio como investigación sin riesgo, teniendo en cuenta que no se realizaron intervenciones en pacientes, solo se tomaron muestras almacenadas en el banco de STEM CELL

De igual manera se siguieron las normas internacionales de protección de datos respetando la integridad del paciente, manteniendo la información anónima. Los datos se almacenan de manera segura acorde con las consideraciones éticas de las bases de datos de salud y cumpliendo los principios que se estipulan en la declaración de Helsinki con respecto al acceso a la información de los pacientes, confidencialidad, información anónima, integridad de la información, documentación, administración y políticas; la misma información se mantendrá guardada por el tiempo que se considere prudente para motivos y desarrollo de este estudio.

**Beneficio para el sujeto estudio:** La información será utilizada para adoptar medidas de gestión médica, mejorando los procesos de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, favoreciendo de manera indirecta al sujeto estudio y la comunidad.

**Riesgos para el sujeto estudio:** No existe riesgo para el sujeto estudio.

**Beneficio para los investigadores:** Los investigadores y colaboradores en el estudio, fueron incluidos como autores en la sección de agradecimientos en el documento final, para motivos de publicaciones y el beneficio que ello conlleva en el ámbito medico

No existe conflicto de interés para los investigadores con relación a los resultados del estudio.

## **BENEFICIOS POTENCIALES PARA LOS PACIENTES, PARA LA COMUNIDAD CIENTÍFICA**

Hasta la fecha, este es el primer estudio en población colombiana que reporta los datos de la existencia de TIMP-2 en sangre de cordón umbilical. Lo anterior, permitirá la creación de un sustento científico que justifique el uso de esta proteína como tratamiento previamente reportado en la literatura internacional, pero aún desconocido en resultados para nuestra población.

## REFERENCIAS

1. Harper, E. Collagenases. Annual Review of Biochemistry. [Internet] 1980. Vol 49(1): 1063–1078. [Cited 12 Apr 2019]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.49.070180.005215?journalCode=biochem>
2. Stetler-Stevenson W, Kruttsch H, Liotta L. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. The Journal of Biological Chemistry. [Internet] 1989. Vol 264 (29): 17374-17378. [Cited 18 sep 2018]. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/264/29/17374.long>
3. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta L A & Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. Brain Research. [Internet]1992. Vol 576 (2): 203-207. [Cited 18 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1381261>
4. Blavier L, DeClerck A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is expressed in the interstitial matrix in adult mouse organs and during embryonic development. Mol Biol Cell. [Internet] 1997. Vol 8(8): 1513–1527. [Cited 22 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285822>
5. Shields, L. E., & Andrews, R. G. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. American Journal of Obstetrics and Gynecology. [Internet] 1998. 178(5), 931–937. [Cited 28 sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609562>
6. BIOSCIENCES, B. D. Introduction to Flow Cytometry: A learning guide. Manual Part. [Internet] 2000; vol. 1, no 1. [Cited 22 Apr 2019]. Disponible: <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>

7. Janowska-Wieczorek, A. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34+ cells in response to chemokines. *Experimental Hematology*. [Internet] 2000; 28(11), 1274–1285. [Cited 16 Sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063876>
8. Ballen, K., Wilson, M., Wu, J., Ceredona, A., Hsieh, C., Stewart, F., ... Quesenberry, P. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplantation*. [Internet] 2001; 27(1):7-14. [Cited 16 Sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244432>
9. Maymon, E., Romero, R., Pacora, P., Gomez, R., Mazor, M., Edwin, S., ... Berry, S. M. A role for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection. *Journal of Perinatal Medicine*, [Internet] 2001; 29(4). [Cited 22 Sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565199>
10. Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J. A., Apgar, J., Wilson, J., ... Gaur, A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical Immunology*. [Internet] 2004; Vol 110(3): 252–266. [Cited 29 apr 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661603003139>
11. Nakagawa, R., Watanabe, T., Kawano, Y., Kanai, S., Suzuya, H., ... Kaneko, M. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *TRANSPLANTATION AND CELLULAR ENGINEERING*. [Internet] 2004; 44(2). [Cited 29 sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962318>
12. Jaworski D, Boone J, Caterina J, Soloway P, Falls W. Prepulse inhibition and fear-potentiated startle are altered in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-

2) knockout mice. Brain Research. [Internet] 2005; 1051: 81-89. [Cited 22 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979591>

13. Jaworski D, Soloway P, Caterina J, Falls W. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) deficient mice display motor deficits. J Neurobiol. [Internet] 2006. Vol 66(1): 82–94. [Cited 25 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1440718/>

14. Cockle, J. V., Gopichandran, N., Walker, J. J., Levene, M. I., & Orsi, N. M. Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Preterm Perinatal Complications. Reproductive Sciences, [Internet] 2007; 14(7), 629–645. [Cited 22 Sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000225>

15. Montalvo, A. (dir). Evaluación genética y microanalítica de las células madre de de la gelatina de Wharton para su utilización en ingeniería tisular. [tesis doctoral en Internet]. [España]: Universidad de Granada; 2008; 242 p. [citado 26 de Abr de 2019]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/1768058x.pdf>

16. DANE, Ministerio de Salud y Protección Social. Glosario. Estadísticas Vitales – Módulo de Nacimientos y Defunciones del RUAFA. [Internet]. Abril 2009. [Cited 7 may 2019]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Glosario%20EEVV.pdf>

17. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity [Review]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. [Internet] 2010. Vol 1803 (1): 55-71. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910000042>

18. Ruiz C, Nariño D, Muñoz J. Epidemiología y carga de la Enfermedad de Alzheimer. Acta Neurol Colomb. [Internet] 2010; 26:Sup (3:1):87-94. [Cited 25 sep 2018]. Disponible en: [https://www.acnweb.org/acta/acta\\_2010\\_26\\_Supl3\\_1\\_87-94.pdf](https://www.acnweb.org/acta/acta_2010_26_Supl3_1_87-94.pdf)

19. Madsen-Bouterse S, Romero R, Tarca A, Kusanovic J, Espinoza J, Kim C et al. The Transcriptome of the Fetal Inflammatory Response Syndrome. *Am J Reprod Immunol.* [Internet]. 2010 January; 63(1): 73–92. [Cited 26 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3437779/>
20. Chandra T, Afree S, Kumar A, Singh U. Correlation of umbilical cord blood volume with CD34+ cells concentration. *International Journal of Blood Transfusion and Immunohematology* 2010; 1: 11-15. [Cited 26 sep 2018]. Disponible en: <http://www.ijbti.com/archive/2011-archive/100003IJBTITC2011-chandra/100003IJBTITC2011-chandra-full-text.php>
21. Wen S, Zhao W, Lin P, Yang K. *cTransfusion and Apheresis Science* [Internet]. 2012; 46: 39–45 [Cited 26 sep 2018]. Disponible en: [https://www.trasci.com/article/S1473-0502\(11\)00221-7/fulltext](https://www.trasci.com/article/S1473-0502(11)00221-7/fulltext)
22. Becton, Dickinson and Company. *BD Cytometric Bead Array: Multiplexed Bead-Based Immunoassays*. BD Biosciences. [Internet]. 2012. [Cited 29 apr 2019]. Disponible en: [https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA\\_Brochure\\_Intl.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Brochure_Intl.pdf)
23. Chandra, T., Afreen, S., Kumar, A., Singh, U., y Gupta, A. Does Umbilical Cord Blood-derived CD34+ Cell Concentration Depend on the Weight and Sex of a Full-term Infant?. *Journal of Pediatric Hematology / Oncology.* [Internet]. 2012; 34(3):184-7. [Cited 16 sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441709>
24. Wan, Z., You, S., Rong, Y., Zhu, B., Zhang, A., Zang, H., ... Xin, S. CD34+ Hematopoietic Stem Cells Mobilization, Paralleled with Multiple Cytokines Elevated in Patients with HBV-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. *Digestive Diseases and Sciences,* [Internet]. 2012; 58(2), 448–457. [Cited 20 sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23095991>



25. Kim, D., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., & Borlongan, C. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. [Internet]. 2013; 14(6), 11692–11712. [Cited 05 May 2019]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/6/11692>
26. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*. [Internet] 2014;344:630–634 [Cited 29 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797482>
27. Lee EJ, Kim HS. The anti-inflammatory role of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *J Neuroinflammation*. [Internet] 2014; 11: 116 [Cited 29 sep 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2497034>
28. Bequer L, Gómez T, Pérez de Alejo L, Molina O, Peláez M, Ferrer M. Estudio bioquímico en sangre del cordón umbilical de recién nacidos teniendo en cuenta edad gestacional y peso al nacer. *Revista del Laboratorio clínico*. [Internet] 2014. Vol 7(3) 111-118 [Cited 01 oct 2018]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-estudio-bioquimico-sangre-del-cordon-S1888400814000610>
29. Moodley KK., Chan D. The Hippocampus in Neurodegenerative Disease. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. [Internet] 2014; 95–108 [Cited 01 oct 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777134>
30. Al-Deghaither S. Impact of maternal and neonatal factors on parameters of hematopoietic potential in umbilical cord blood. *Saudi Med J*. [Internet] 2015 Jun; 36(6): 704–712 [Cited 01 oct 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454905/>

31. Rodríguez F, Riaño D, León A, Mosquera A, Rojas A, Augusto C, et al. Correlación entre características físicas neonatales y maternas con el recuento total de células nucleadas y de células CD34+ por microlitro en sangre de cordón umbilical. *Revista Med.* [Internet] 2015; 23 (2): 71-77 [Cited 01 oct 2018]. Disponible en: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rmed/article/view/1749>
32. Aguirre, E. La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento. *Revista Mexicana de Neurociencia.* [Internet] 2015; 16(4): 21-30 [Cited 02 oct 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=64941>
33. Castellano JM, Kirby ED, Wyss-Coray T. Blood-borne revitalization of the aged brain. *JAMA Neurol.* [Internet] 2015;72:1191–1194 [Cited 02 oct 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4867550/>
34. Garcia B, Rubio F, Crespo M. *Técnicas de análisis hematológico.* Paraninfo. 2015. España: 258-259.
35. Olaya, M; Vargas, W; Bernal, J. Una aproximación desde la física a las consecuencias patológicas de la longitud excesiva del cordón umbilical. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* [Internet]. 2015; Vol. 66 No. 1 (53-60) [Cited 5 feb 2019]; . Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v66n1/v66n1a07.pdf>
36. Olivares, J., Juárez, E., García, F. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV,* [Internet] 2015; 20-28. [Cited 06 May 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Fabio\\_Garcia-Garcia/publication/282251666\\_El\\_hipocampo\\_neurogenesis\\_y\\_aprendizaje/links/5609813a08ae840a08d3afa6.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Fabio_Garcia-Garcia/publication/282251666_El_hipocampo_neurogenesis_y_aprendizaje/links/5609813a08ae840a08d3afa6.pdf)

37. Lee, C., An, J., Kim, J. H., Kim, E. S., Kim, S. H., Cho, Y. K., ... Sheen, Y. H. Low levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at birth may be associated with subsequent development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Korean Journal of Pediatrics*, [Internet] 2015; 58(11), 415. [Cited 20 Sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4675921/>
38. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* [Internet] 2016; Vol 37(2), 163–176. [Cited 10 Apr 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7e79/b4057a7a9f0cdaadca7c2dbb15e0e3c1b3cd.pdf>
39. Castellano J, Mosher K, Abbey RJ, McBride A, James M, Berdnik D, Shen J, Zou B, Xie X, Tingle M, Hinkson I, Angst M, Wyss-Coray T. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*. [Internet] 2017; Apr 27;544(7651):488-492. [Cited 10 oct 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5586222/>
40. Wang, L., Wang, D. Liu, M. Yao, R. Correlation between Tissue Characterization and Dynamic Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Its Tissue Inhibitor in Conjunctival Filtering Bleb of Rats. *Biomed research international*. [Internet] 2017; 2017, 10 pages. [Cited 16 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5624151/pdf/BMRI2017-1054129.pdf>
41. Gayatri, R., Crasta, J., Thomas, T., Pratibha, D., Thomas, A., Sridhar, T. S., Kurpad, A. V. Structural Analysis of the Umbilical Cord and Its Vessels in Intrauterine Growth Restriction and Pre-eclampsia. *Journal of Fetal Medicine*. [Internet]. 2017; 4(2), 85–92. [Cited 27 Abr 2019]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40556-017-0118-2>

42. Mottet, N., Chaussy, Y., Arbez-Gindre, F., & Riethmuller, D. Fisiología y patologías del cordón umbilical. EMC - Ginecología-Obstetricia. [Internet]. 2017; 53(4), 1–12. [Cited 17 May 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1283081X17868879>

43. Sundrani D, Narang A, Mehendale S, Joshi S, Chavan-Gautam P. Investigating the expression of MMPs and TIMPs in preterm placenta and role of CpG methylation in regulating MMP-9 expression. IUBMB Journals. [Internet]. 2017; 69, 985-993 [Cited 18 Jul 2019]. Disponible en: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.1687>

44. Zarkesh M, Zadeh-Vakili A, Azizi F, Fanaei SA, Foroughi F, Hedayati M. The Association of BRAF V600E Mutation With Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Expression and Clinicopathological Features in Papillary Thyroid Cancer. International Journal of Endocrinology and Metabolism. [Internet] 2018; 16(2): e56120. [Cited 16 oct 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5972213/>

45. Mashayekhi F, Saberi A, Mashayekhi S. Serum TIMP1 and TIMP2 concentration in patients with different grades of meningioma. Clinical Neurology and Neurosurgery. [Internet] 2018. 170, 84-87. [Cited 10 feb 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303846718301756?via%3Dihub>

46. Liu Z, Ren Y, Zhu F. Expression of MMP-2 and TIMP-3 with incidence and prognosis of giant-cell tumor of the bone. Oncology Letters. Oncol Lett. [Internet] 2018; 16 (1): 721–726. [Cited 16 oct 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019976/>

47. R&D Systems. Quantikine ELISA - Human TIMP-2 Immunoassay. Catálogo DTM200 [Internet]. 2018. [Cited 18 mar 2019]. Disponible en: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dtm200.pdf>

48. Wang, W. Zhang, Y. Liu, M. Wang, Y. Yang, T. Li, D. Li, Q. TIMP2 is a Poor Prognostic Factor and Predicts Metastatic Biological Behavior in Gastric Cancer. Scientific Reports (Nature Publisher Group). [Internet]. 2018; 8, 1-11. [Cited 18 mar 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/central/docview/2059010336/E4BDA59C6A134AE0PQ/1?accountid=50438>

49. R&D SYSTEMS a biotechne brand. Quantikine ELISA Human TIMP-2 Immunoassay [Internet]. USA R&D Systems, Inc; 2018. [Cited 16 mar 2019]. Disponible en: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dtm200.pdf>

50. Camacho, M., Escalona, R., Romero, S., Vargas, M., Zúñiga, M., Mora. J. Células madre de sangre de cordón umbilical: obtención, aplicaciones y situación en Costa Rica. REVISTA MÉDICA DE LA UNIVERSIDAD DE COSTA RICA. [Internet]. 2018; Vol 12 N° 1. . [Cited 16 sep 2019]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/medica/article/view/34612>

51. Schaduangrat, N, Prachayasittikul, V, Choomwattana, S, Wongchitrat, P, Phopin, K, Suwanjang, W, et al. Multidisciplinary approaches for targeting the secretase protein family as a therapeutic route for Alzheimer's disease. Medicinal Research Reviews. [Internet] 2019. [Cited 16 Mar 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30628099>

52. Medeiros, N. I., & Gomes, J. Cytometric Bead Array (CBA) for Measuring Cytokine Levels in Chagas Disease Patients. *T. Cruzei Infection*. [Internet] 2019; vol 1955 309–314. [Cited 29 Apr 2019]. Disponible en: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9148-8\\_23](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9148-8_23)

53. Malemud CJ. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. *Biochem Pharmacol*. [Internet] 2019;165:33-40. [Cited 29 sep 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/30826330/>

54. Biolegend® Enabling Legendary Discovery™. Human TIMP Mix and Match Subpanel. [Internet] Vol 2. [Cited 29 sep 2018]. Disponible en: [https://www.biolegend.com/Files/Images/media\\_assets/pro\\_detail/datasheets/7508\\_4\\_Hu\\_TIMP\\_Mix\\_and\\_Match\\_Subpanel\\_V2.pdf](https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/7508_4_Hu_TIMP_Mix_and_Match_Subpanel_V2.pdf)

## ANEXOS

### 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### IDENTIFICACIÓN DE TIMP-2 EN PLASMAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS COLOMBIANOS Y SU CORRELACIÓN CON VARIABLES PERINATALES UTILIZANDO EL MÉTODO CBA EN CITOMETRÍA DE FLUJO

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Dra. Luz Mabel Ávila.

**COINVESTIGADORES:** Valerie Niyireth Cardenas Lopez, Laura Vanessa Guevara Sotelo, Jenniffer Avila Garcia, Ginna Paola Saavedra

#### I. INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN, PROCEDIMIENTO Y PARTICIPACIÓN

La sangre de cordón umbilical (**UCB**), es la sangre que queda depositada entre la placenta y el cordón después del nacimiento del Neonato. en esta se encuentran células madre de diferentes tipos y el plasma sanguíneo, el cual no ha sido ampliamente investigado, sin embargo, se ha reportado la presencia de citoquinas, factores proinflamatorios, restos de actividad metabólica, se ha descrito que se encuentra la proteína **TIMP-2** (inhibidor tisular de metaloproteinasas 2), esta desempeña un papel importante en la inactivación de las metaloproteinasas (proteínas encargadas en la degradación de la matriz extracelular), y es importante en el funcionamiento del hipocampo. Varios estudios han relacionado la pérdida de funcionalidad del hipocampo a la vejez, debido a alteraciones en las áreas anteriormente mencionadas, dando lugar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Investigaciones en animales han demostrado las consecuencias de la inexpressión de TIMP-2, donde roedores han desarrollado problemas relacionados con la pérdida de memoria, déficits motores, dificultades en la neurogénesis, entre otros. Por otro lado, se ha realizado infusión de plasma de UCB rico en TIMP-2 a ratones viejos, demostrando que esta proteína juega un papel importante en el hipocampo de estos animales, observando que adquieren habilidades de memoria posterior a la aplicación. Dado lo anterior, esta proteína está siendo investigada para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Diferentes investigaciones, han permitido demostrar que TIMP-2 es importante en la revitalización del hipocampo, por lo que se postuló el uso de esta proteína como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas. Además, se evidencio, que plasma de sangre de cordón umbilical contiene mayor cantidad de TIMP-2 que el plasma de sangre de individuos adultos, lo que comprueba que los niveles de TIMP-2 disminuyen al aumentar la edad.

Teniendo en cuenta lo anterior, lea detenidamente esta información y no dude en hacer al equipo médico del estudio todas las preguntas que desee para asegurarse

de que es capaz de tomar una decisión informada sobre la participación. Usted no tiene ninguna obligación de participar en este estudio y si decide no hacerlo, su tratamiento futuro no se verá afectado en modo alguno.

### **¿Cuál es la finalidad de este estudio?**

El objetivo de este estudio es identificar y cuantificar la proteína TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical y evidenciar si existe correlación alguna de la presencia de esta proteína con variables perinatales en muestras de recién nacidos.

### **¿Qué criterios exigen para participar en esta aplicación?**

- Muestras provenientes de recién nacidos sanos que no presentaron complicaciones al nacer
- Estar de acuerdo y haber firmado previamente el consentimiento informado.

### **Extracción y obtención de muestras**

La extracción y obtención de las muestras será realizada con protocolos y por profesionales de STEM Medicina Regenerativa

### **Procedimiento**

Al finalizar el alumbramiento, se procederá a pinzar y desinfectar el cordón umbilical, posteriormente se puncionara la vena del cordón umbilical con una aguja unida a la bolsa recolectora, con la finalidad de recolectar la sangre de cordón umbilical. Se recolectara la sangre y posterior a la extracción, esta será enviada a STEM Medicina Regenerativa para su procesamiento.

A su llegada al laboratorio, se buscará obtener el plasma de sangre de cordón umbilical y adicionalmente, se realizarán pruebas que determinen la calidad de la muestra. Los plasmas que cumplan con los criterios anteriormente mencionados, serán utilizados en el estudio.

### **Molestias y riesgos**

El procedimiento mencionado anteriormente no generará dolor o molestia alguna para usted y su bebé. De igual modo, tampoco pone en riesgo la vida de ninguno de los dos.

### **Beneficios**

Su participación en esta investigación no le generará ningún tipo de beneficio o retribución económica o de cualquier otra índole. El beneficio que obtiene con su participación es la satisfacción de contribuir al desarrollo de investigación tanto básica como clínica utilizando plasma de cordón umbilical.

### **Inquietudes y aclaraciones**

El equipo de investigación se compromete a resolver sus preguntas y aclarar cualquier duda referente al estudio (procedimiento, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y su participación). Usted tiene el derecho



a que se le responda de forma clara todas las preguntas hasta que usted quede con plena satisfacción.

### **Participación**

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Si por alguna causa en el transcurso del estudio decide abandonarlo no tendrá ninguna represalia por hacerlo.

### **Confidencialidad de la información**

Los datos suministrados por usted al equipo de investigación, que serán utilizados para la correcta identificación de la muestra, serán manejados bajo total confidencialidad; de este modo, los datos no podrán ser vendidos, divulgados o transferidos a ninguna entidad ajena a la investigación.

### **Eventos adversos**

El procedimiento a realizar no generará ningún tipo de evento adverso.

## **II. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **Declaro que:**

Entiendo que el plasma de sangre de cordón umbilical recolectada en el nacimiento de nuestro hijo (a) será utilizado con el objeto identificar, cuantificar y correlacionar la presencia de TIMP-2 a características perinatales,. Entiendo que la información referente a mi persona será tratada de forma confidencial y codificada de forma que quede protegida. Entiendo que la donación de sangre de cordón umbilical fue altruista y que no deriva de ninguna compensación. Conservó la posibilidad de renunciar a este consentimiento en cualquier momento de la investigación.

He leído y comprendido toda la información dada, estoy satisfecho(a) de la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas. Una copia de este consentimiento me será entregado posterior a la firma.

**En consecuencia, doy mi consentimiento para el procesamiento de plasmas de sangre de cordón umbilical para identificación, cuantificación y correlación de TIMP-2.**

### **SUJETO DE INVESTIGACIÓN O SU REPRESENTANTE LEGAL**

Nombre: \_\_\_\_\_

Relación: \_\_\_\_\_ Cédula: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

### **TESTIGOS**

Nombre: \_\_\_\_\_

Relación: \_\_\_\_\_ Cédula: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Relación: \_\_\_\_\_ Cédula: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**Investigador que realiza registro de datos y suministra información**

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

FIRMA

## 2. BASE DE DATOS SELECCIÓN DE MUESTRAS

	VARIABLE DEPENDIENTE		VARIABLES INDEPENDIENTES								
#	[ ] TIMP-2 (CON FD)	TIMP-2 pg/ml (SIN FD)	VOL (mL) + CoA*	FD	REC. CN	CD34+ /UL	TIPO DE PARTO	PESO	TALL A	SEMANAS	SEXO
1	86,6	55,61	89,51	1,64	10.700	89,52	CESÁREA	2900	34	37	MASCULINO
2	71,2	33,89	108,56	1,48	9.500	120,72	CESÁREA	3737	50	39	MASCULINO
3	91,8	44,22	107,62	1,48	6.400	25,75	CESÁREA	3040	51	39	FEMENINO
4	48,3	36,98	80,69	1,77	12.700	37,34	CESÁREA	2949	49	40	MASCULINO
5	48,8	34,88	89,51	1,83	7.600	65,23	CESÁREA	3490	51	38,6	MASCULINO
6	66,8	38,06	96,45	1,57	11.800	160,91	CESÁREA	3970	52	40	FEMENINO
7	165,5	106,04	89,61	1,64	7.100	80,47	PARTO NATURAL	3630	53	39	FEMENINO
8	115,2	64,43	97,58	1,56	10.700	43,32	CESÁREA	2320	48	37	MASCULINO
9	74,6	39,28	101,43	1,53	5.100	23,61	CESÁREA	2979	51	39	MASCULINO
10	17,9	16,39	73,25	1,92	5.800	92,41	CESÁREA	1997	43	33+	MASCULINO
11	41,5	30,45	82,66	1,73	20.500	168,59	PARTO NATURAL	3040	49	37+4	FEMENINO
12	133,2	69,29	102,27	1,52	10.200	96,87	CESÁREA	3096	50	39	FEMENINO
13	47,6	30,49	89,68	1,64	6.100	21,98	CESÁREA	3300	50	38	MASCULINO
14	62	28,66	110,66	1,46	15.300	217,95	CESÁREA	3180	48	38,3	FEMENINO
15	108,5	43,15	123,03	1,40	10.200	153,92	CESÁREA	3212	50	38	FEMENINO
16	124,4	43,65	134,73	1,35	6.200	143,98	CESÁREA	3900	50	39	FEMENINO
17	63,3	37,19	94,55	1,59	8.500	52,82	PARTO NATURAL	2910	50	38	FEMENINO
18	89,8	51,94	95,53	1,58	6.800	107,23	CESÁREA	2890	46	39	MASCULINO
19	103,7	49,36	108,53	1,48	5.400	111,05	CESÁREA	2740	47	39	MASCULINO
20	37	28,57	80,30	1,77	7.900	54,18	CESÁREA	3020	50	38+1	FEMENINO
21	157	59,39	127,53	1,38	10.800	204	CESÁREA	3250	50	39	MASCULINO
22	215,4	107,81	104,93	1,50	9.400	90,16	CESÁREA	3333	49	37	MASCULINO
23	76,1	35,81	109,39	1,47	8.800	63,3	CESÁREA	1520	41	38	FEMENINO
24	91,7	38,79	117,73	1,42	7.500	117,74	CESÁREA	3400	51	39	FEMENINO
25	107,6	51,20	108,53	1,48	6.300	77,02	CESÁREA	3260	51	37	MASCULINO
26	47,9	31,93	87,54	1,67	5.800	44,57	CESÁREA	2800	49	38,4	FEMENINO
27	50,5	34,97	85,53	1,69	6.100	98,95	CESÁREA	2990	49	34	MASCULINO
28	44,3	36,07	78,03	1,81	6.400	58,19	CESÁREA	2660	48	37	MASCULINO
29	74,9	37,97	104,05	1,51	10.300	76,71	CESÁREA	4800	53	39+3	FEMENINO
30	376,8	143,13	127,13	1,38	9.500	345,6	CESÁREA	3340	49	39	FEMENINO
31	54	44,87	77,09	1,83	4.300	44,54	CESÁREA	2760	49	37+2	FEMENINO
32	99,3	46,0	110,59	1,46	9.200	91,68	CESÁREA	3150	51	38,3	MASCULINO
33	92,8	44,15	108,55	1,48	10.200	273,36	CESÁREA	3550	49	38	MASCULINO
34	175,5	58,83	139,44	1,34	9.700	99,93	PARTO NATURAL	3380	49	38,5	MASCULINO
35	30,2	25,08	77,18	1,83	9.500	46,31	CESÁREA	2900	49	38	FEMENINO

36	49,4	43,57	74,69	1,88	8.300	51,07	CESÁREA	2792	48	39,7	FEMENINO
37	32,1	19,94	91,39	1,62	9.200	47,23	CESÁREA	3750	51	39	MASCULINO
38	37,4	17,98	107,90	1,48	6.600	90,51	CESÁREA	3100	50	39	FEMENINO
39	74	36,02	106,93	1,49	8.300	71,04	PARTO NATURAL	3260	50	39	MASCULINO
40	69,3	36,07	102,20	1,52	7.100	85,61	CESÁREA	3175	49	38	FEMENINO
41	37,1	21,74	94,66	1,59	7.900	48,88	PARTO NATURAL	3120	49	39	MASCULINO
42	32,1	22,21	85,66	1,69	6.000	38,7	CESÁREA	2510	49	37	FEMENINO
43	59,4	50,16	76,42	1,85	10.500	72,76	CESÁREA	3150	51	39	FEMENINO
44	53,5	37,11	85,48	1,69	6.500	27,35	CESÁREA	2630	48	38,4	MASCULINO
45	203,4	71,63	134,40	1,35	10.200	129,9	CESÁREA	3120	48	37,5	FEMENINO
46	116	47,86	119,86	1,41	13.600	180	CESÁREA	3320	48	39	FEMENINO
47	47,4	32,54	85,93	1,69	6.000	52,19	CESÁREA	3560	50	39+4	MASCULINO
48	288,8	106,27	130,10	1,37	9.600	73,86	CESÁREA	3235	50	38	MASCULINO
49	194,1	90,26	110,28	1,46	8.500	133,52	CESÁREA	3060	50	38,4	MASCULINO
50	120,5	56,46	109,71	1,47	8.100	53,7	CESÁREA	3990	52	39	MASCULINO
51	115,9	73,94	93,88	1,71	11.000	33,85	CESÁREA	2793	48	38 1/2	MASCULINO
52	255,2	88	137,96	1,34	8.800	108,81	PARTO NATURAL	2990	49	38 3 DÍAS	MASCULINO
53	80,9	48,63	93,25	1,60	9.900	53,12	PARTO NATURAL	3705	52	38 5 días	FEMENINO
54	125,7	51,69	120,09	1,41	15.500	403,81	CESÁREA	3125	51	38	FEMENINO
55	133,8	59,39	113,86	1,44	16.100	168,23	CESÁREA	3420	49	38	MASCULINO
56	51,5	35,77	85,36	1,69	5.700	9,24	PARTO NATURAL	2817	47	38	FEMENINO
57	122,7	50,77	120,59	1,43	8.300	53,25	CESÁREA	3100	51	39	FEMENINO
58	97,7	50,73	102,40	1,52	16.200	144,74	CESÁREA	3470	49	39	FEMENINO
59	106,8	69,16	89,06	1,65	11.300	74,86	CESÁREA	3410	49	39	FEMENINO
60	67,6	52,86	79,78	1,78	6.800	22,1	PARTO NATURAL	3133	50	39	MASCULINO

*\*Todas las muestras contenían 35 mL de anticoagulante CPDA-1*