



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

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

Dirigido por:

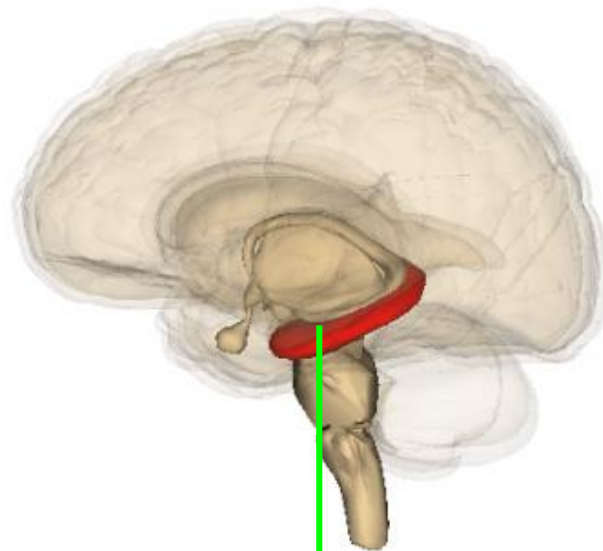
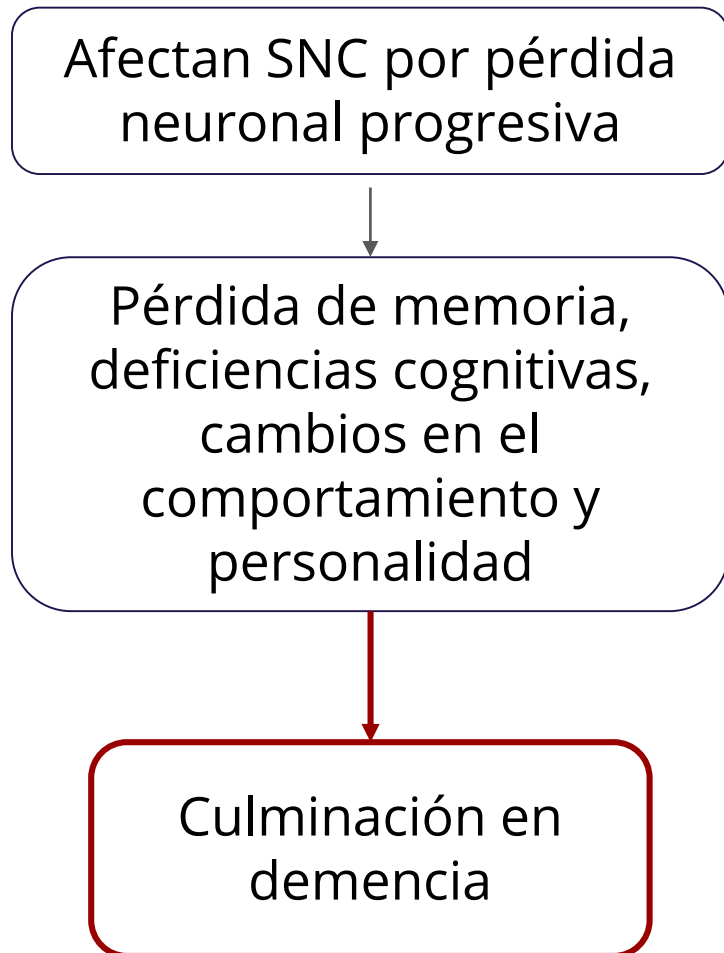
Asesora interna: Omaira Yaneth López Castro MSc. en Infecciones y Salud en el Trópico

Asesora externa: Luz Mabel Ávila Portillo cPhD. en Ciencias Farmacéuticas

Noviembre. 2019

Introducción

Enfermedades neurodegenerativas. En el 2010 afectó a 44 millones de personas.



Hipocampo degradado por MMP

Memoria declarativa

Ubicación temporo espacial

Estudios de TIMP-2 a lo largo del tiempo

Rosenberg et al.
TIMP-2 recupera la barrera hematoencefálica

1992

Janowska et al.
Células CD34+ secretan TIMP-2

2000

Jaworski et al.
TIMP-2 en hipocampo

2005

Lee et al. Bajo TIMP-2 con aparición de displasia broncopulmonar

2015

Castellano et al.
TIMP-2 está en el plasma de SCU, revitaliza el hipocampo.

2017

1989
Stetler et al.
Descubrimiento y nombre de TIMP-2

1997
Blavier et al.
Equilibrio en MEC por TIMPs

2001
Maymon et al.
TIMP-2 remodela la membrana amniótica

2014
Katsimpardi et al.
Sangre de ratones jóvenes beneficia a ratones ancianos



**Comparten
12 residuos
de cisteína:**

Permite inhibir
las MMP.

**Inhibidor
Tisular de las
Metaloprotei-
nasas (TIMP)**

TIMP-1

1970 inhibiendo la
colagenasa

TIMP-2

Plasticidad sináptica.
Importante en SNC

TIMP-3

Mayor espectro de
inhibición, ADAM y
ADAMTS.

TIMP-4



Proteína no
glicosilada de 194
aminoácidos.

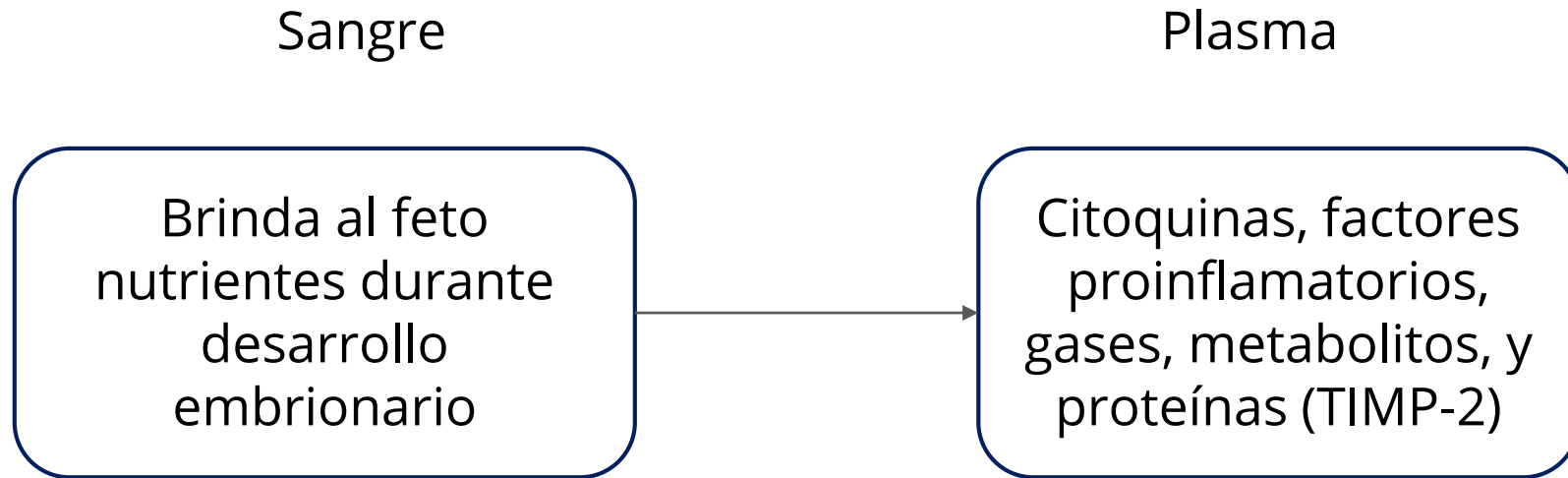
Peso molecular:
20 a 30 kD.

Expresión
progenitoras
neuronales

Estudios
científicos

Pulmones, Piel,
Órganos
reproductivos,
Placenta, Cerebro,
y plasma de SCU
humano

Sangre de Cordón Umbilical



Aún es descartada como un producto de desecho biológico durante el nacimiento. Al conocer que TIMP-2 remodela el hipocampo, es posible ver a futuro el uso de esta proteína como alternativa terapéutica en enfermedades como el Alzheimer.

Planteamiento del Problema

En qué concentración se encuentra TIMP-2 y si hay variables neonatales que afecten dicha concentración en el plasma de SCU.

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.

Objetivos específicos

Identificar TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical por el método CBA por citometría de flujo.

Correlacionar estadísticamente las variables neonatales que afectan la concentración de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical.

Materiales y métodos

Este estudio es de tipo observacional descriptivo de corte transversal con componente analítico. Presentado al comité de Ética del Hospital Militar Central

Población:
Neonatos
colombianos

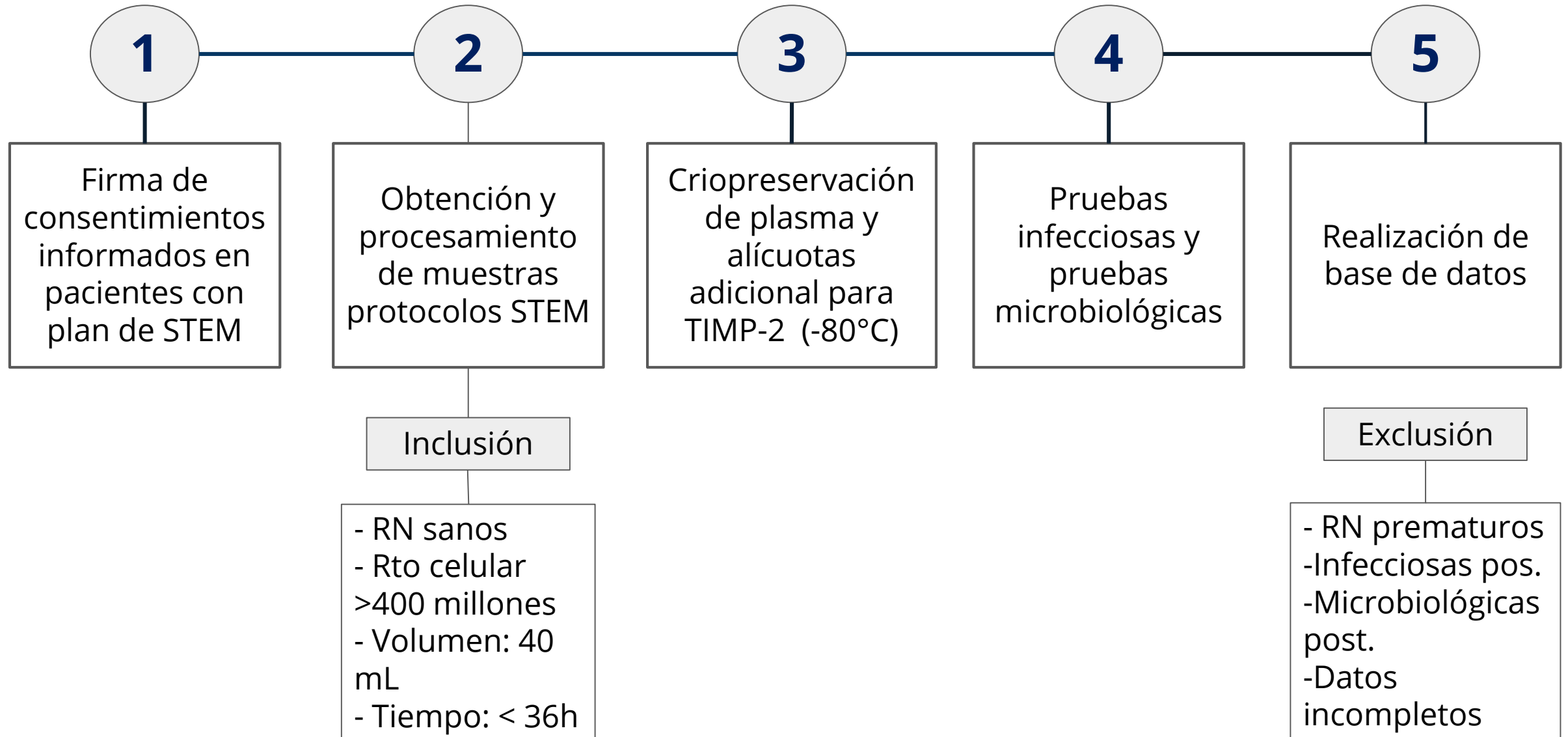
Tamaño estimado
de la muestra: 56
muestras

Variables cualitativas	
Sexo	Características externas de los genitales
Vía de parto	Vía por la cual se dió el nacimiento
Variables cuantitativas	
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+/ μL	Conteo de células CD34+ en la muestra obtenida por microlitro (μL)
TIMP-2 ng/ml	Concentración de la proteína TIMP-2 en cada muestra analizada (ng/ml)

Variables

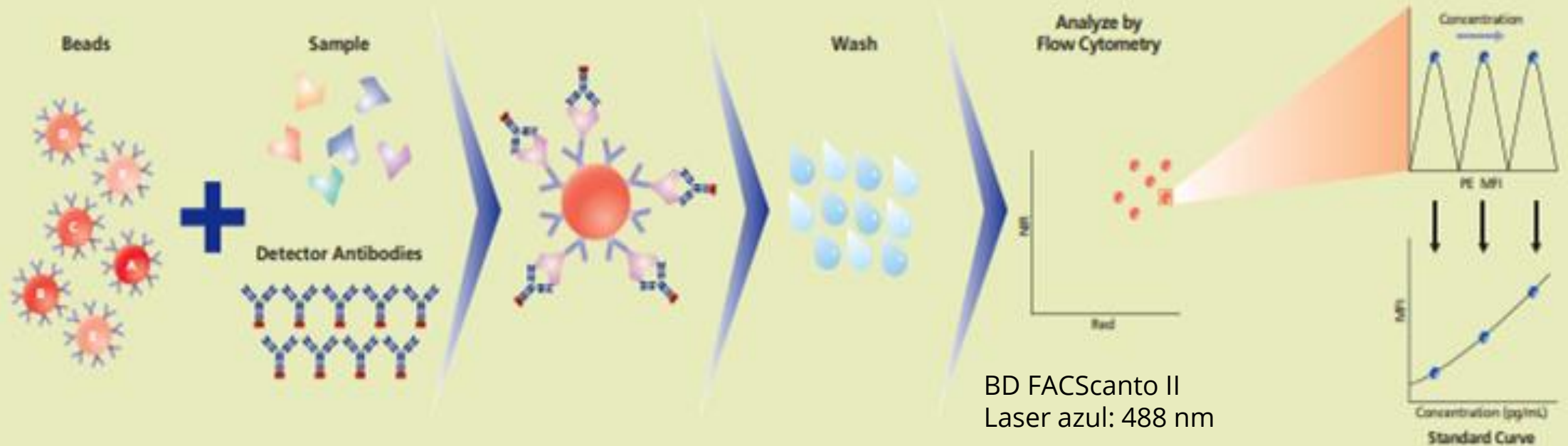
Elaboración propia

Selección y procesamiento de muestras



Determinación de TIMP-2 por CBA (Cytometric Bead Array)

Kit LEGENDplex™ Human TIMP Mix and Match (CAT 75084_V02)



Análisis estadístico

**Variables
continuas**

**Variables
categóricas**

Estadísticas
descriptivas

Se describieron
en porcentajes

**Nivel de
significación
de 0,05**

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk

Coeficiente de Spearman

Programa estadístico STATA Ver. 12
Hospital Militar Central

Resultados y Discusión

Características de 60 unidades de plasma de sangre de cordón umbilical

De 100 muestras recolectadas, 60 cumplieron con todos los criterios

Sexo	n (%)
Masculino	30 (50)
Femenino	30 (50)
Vía de Parto	
Cesárea	50 (83.3)
Parto Vaginal	10 (16.57)

Elaboración propia

Características de unidades de plasma de sangre de cordón umbilical

Variable	Media	SD*	Mediana	Mínimo	Máximo
Talla (cm)	49.11	2.79	49	34	53
Peso al nacer (g)	3152.13	482.06	3129	1520	4800
Periodo gestacional (semana)	38.18	1.17	38	33	40
Volumen (mL)	101.26	66.84	101.5	73	139
CD34+ (uL)	97.14	74.53	76.95	9.24	403.81
Recuento CN (10³/ul)	9.07	3.11	8.65	4.3	20.5
TIMP-2 (ng/ml)	97.73	66.84	78.5	17.9	376.8

Elaboración propia

VARIABLES	INTERVALOS	Frecuencia	MEDIA	TIMP-2
Volumen (ml)	73 - 83	10	44,9	↓
	83,1 - 93	12	64,1	↓ ↑
	93,1 - 103	11	93,8	↓ ↑
	103,1 - 113	14	101,4	↓ ↑
	113,1 - 123	5	117,9	↑
	123,1 - 133	3	232,7	↑↑ (376,8)
	133,1 - 143	4	189,6	↑↑
Parto	Cesarea	50	97,0	↓ ↑
	Parto Natural	10	100,2	↓ ↑
Peso (gr)	1501 - 2500	3	69,7	↓
	2501 - 3500	47	110,6	↑
	3501 - 4800	10	80,65	↓
Sexo	Femenino	30	93,26	↓ ↑
	Masculino	30	100,2	↓ ↑
Semanas de gestación	<36	2	34,2	↓
	36-38	20	105,7	↑ ↑
	38,1-40	38	105,5	↑ ↓

Variables representadas en intervalos y el comportamiento de TIMP-2
Elaboración propia.

VARIABLES	INTERVALOS	Frecuencia	MEDIA	TIMP-2
Talla (cm)	30 - 40	2	86,6	↓ ↑
	40,1 - 50	44	100,3	↓ ↑
	> 50	15	90,8	↓ ↑
CD34+ (uL)	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)
	369,6-429,6	1	255,1	↑↑
	Recuento CN (10 ³ /ul)	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	↓

Variables representadas en intervalos y el comportamiento de TIMP-2
Elaboración propia.

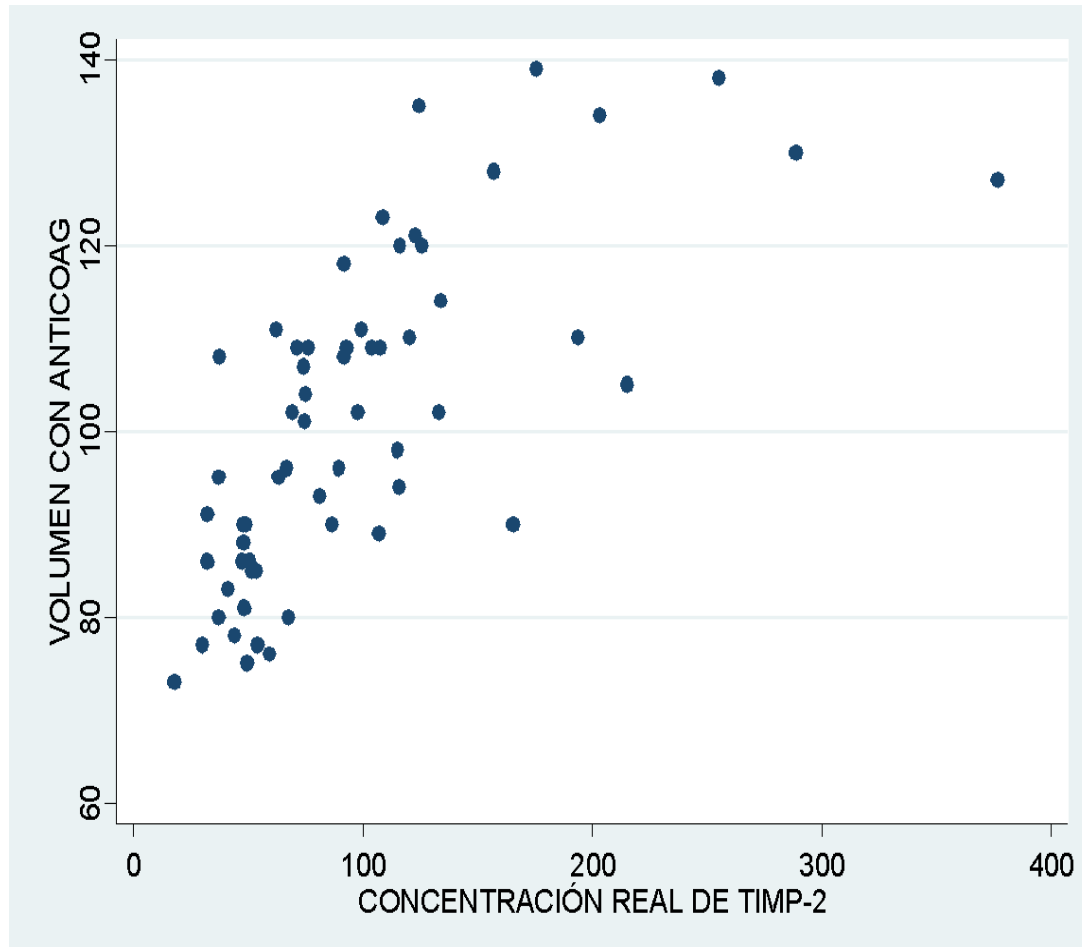
Correlaciones entre factores neonatales y el concentracion de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical (Coeficiente de Spearman)

	Volumen (ml) rho(p)	Recuento CN (10³/ul) rho(p)	CD34+ (uL) rho(p)	Peso rho(p)	Edad gestacional rho(p)	Sexo rho(p)	Vía de parto rho(p)
TIMP-2 (ng/mL)	0.77 (0.000)	0.36 (0.004)	0.47 (0.0001)	0.30 (0.019)	0.05 (0.68)	0.05 (0.66)	0.01 (0.93)
CD34+ (uL)	0.59 (0.0000)	0.48 (0.0001)	1	0.38 (0.0026)	0.02 (0.87)	0.11 (0.37)	0.13 (0.29)
Recuento CN (10³/ul)	0.29 (0.024)	1	0.34 (0.007)	0.31 (0.015)	0.10 (0.44)	0.13 (0.28)	0.02 (0.82)

Elaboración propia

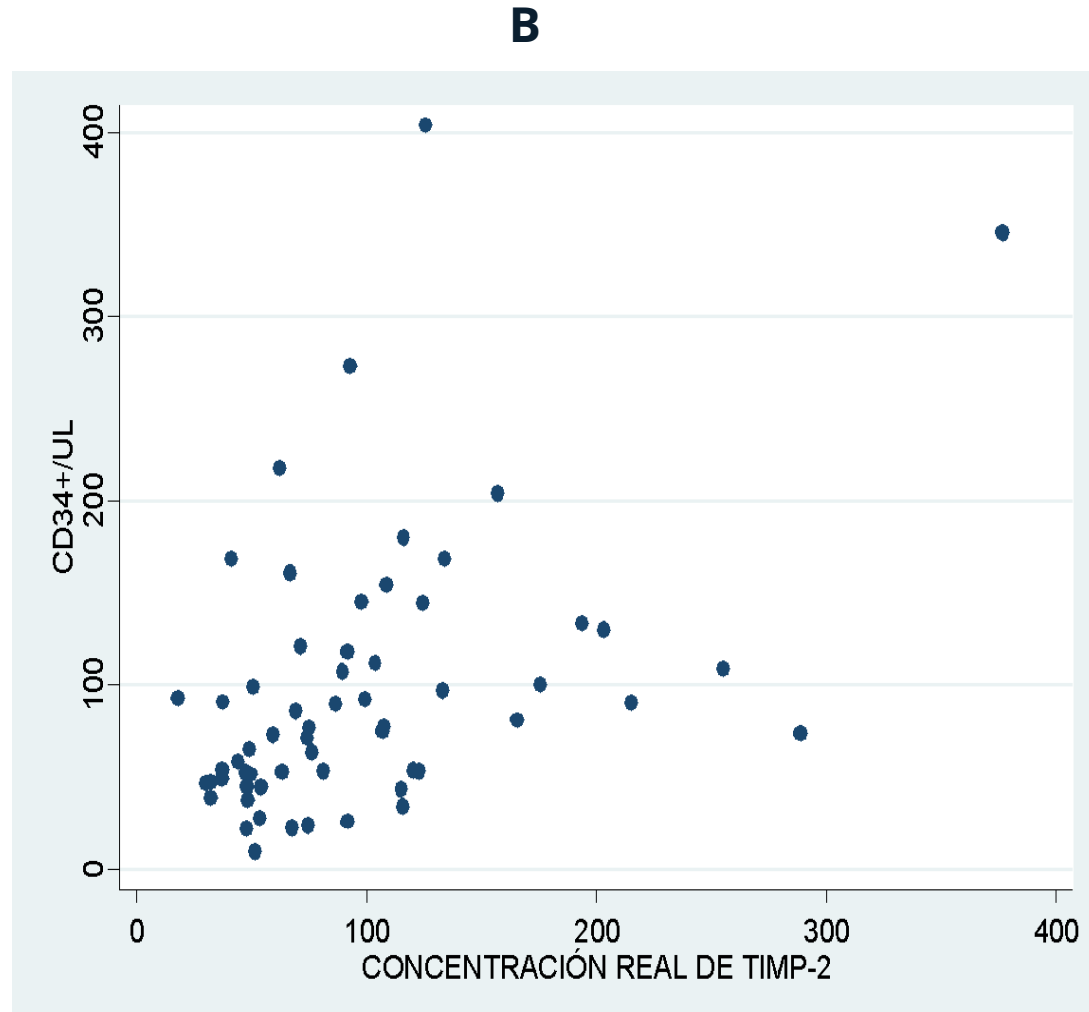
Variables correlacionadas con el contenido de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical

A



Correlación positiva entre el volumen y TIMP-2 $\rho = 0.77$.
Elaboración propia

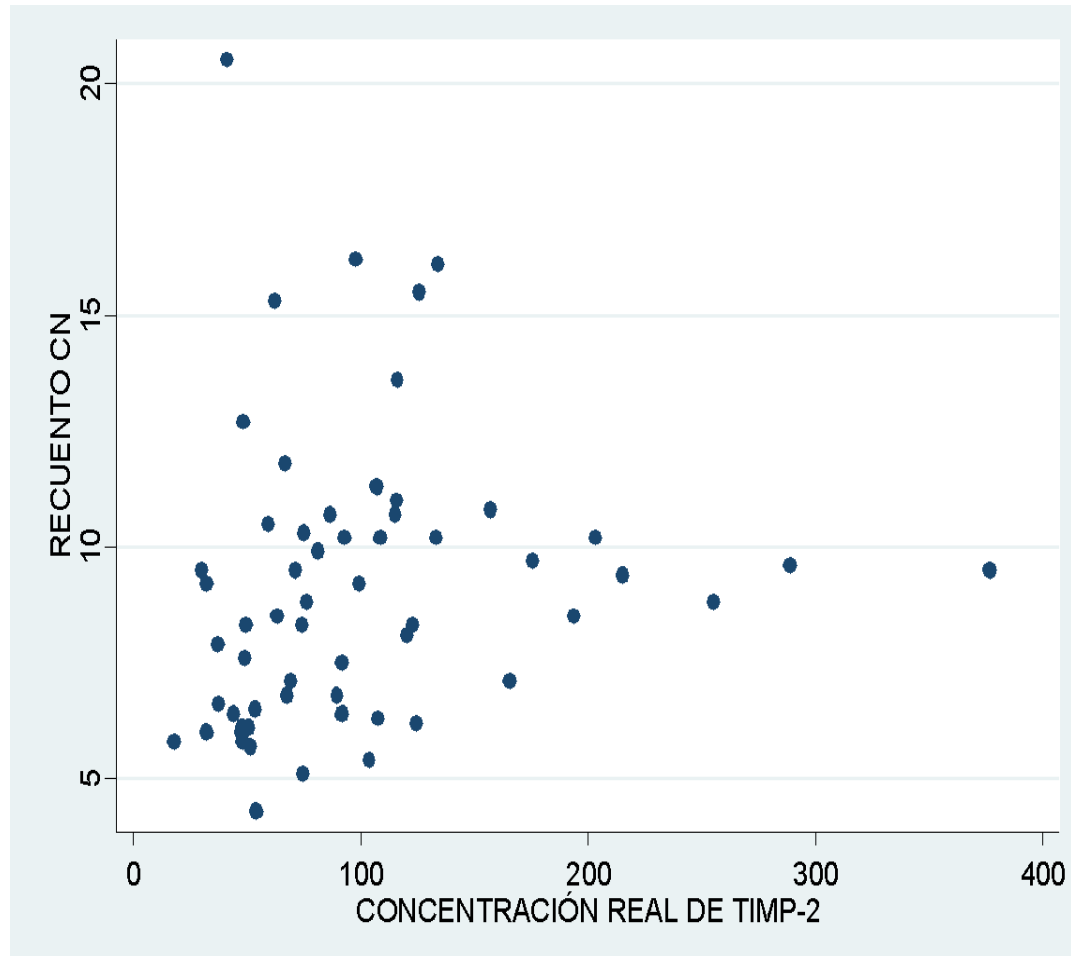
Variables correlacionadas con el contenido de TIMP-2 en plasma de sangre de cordón umbilical



Correlación positiva entre CD34+
y TIMP-2 $\rho=0.47$.
Elaboración propia

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

C



Correlación positiva entre Recuento de CN y TIMP-2 $\rho = 0.36$
Elaboración propia

CONCLUSIONES

- ❑ El 90% de las muestras superaron el intervalo de concentración en plasmas de adultos (12,8 a 26,4 ng/ml)
- ❑ En este estudio obtuvimos un rango entre 17,9 a 376,8 ng/ml en plasma de SCU aún no existe un estudio de intervalos de referencia en plasma de SCU
- ❑ La concentración de TIMP-2 se encuentra correlacionada con las variables neonatales de Volumen, CD34+, CNT; por lo cual se deberían tener en cuenta a la hora de seleccionar una muestra de sangre de cordón umbilical para obtención de TIMP-2 como fuente de tratamiento para enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES

- ❑ 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 de las CD34+, sino de otras células o tejidos fetales. Sin embargo es importante realizar otros estudios que soporten esta hipótesis .

PREGUNTAS

REFERENCIAS

1. 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>
2. 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>
3. 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>
4. 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>
5. 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>
6. 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>
7. 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>

REFERENCIAS

8. 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>
9. 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>
10. 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>
11. 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
12. 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/>
13. 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>
14. 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>
15. 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>

REFERENCIAS

16. 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>
17. 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>
18. 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/>
19. 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/>
20. 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>
21. 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/>
22. 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/>
23. 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/75084_Hu_TIMP_Mix_and_Match_Subpanel_V2.pdf