



Determinación de proteínas neuromoduladoras TIMP-2 y sgp130 en plasma de sangre de cordón umbilical en neonatos colombianos y su correlación con variables materno fetales

Lizeth Daniela Holguin Rincon
Katherin Julieth Lemus Lopez
Cesar Andres Tovar Suárez

Bogotá D.C.
30 Abril de 2020

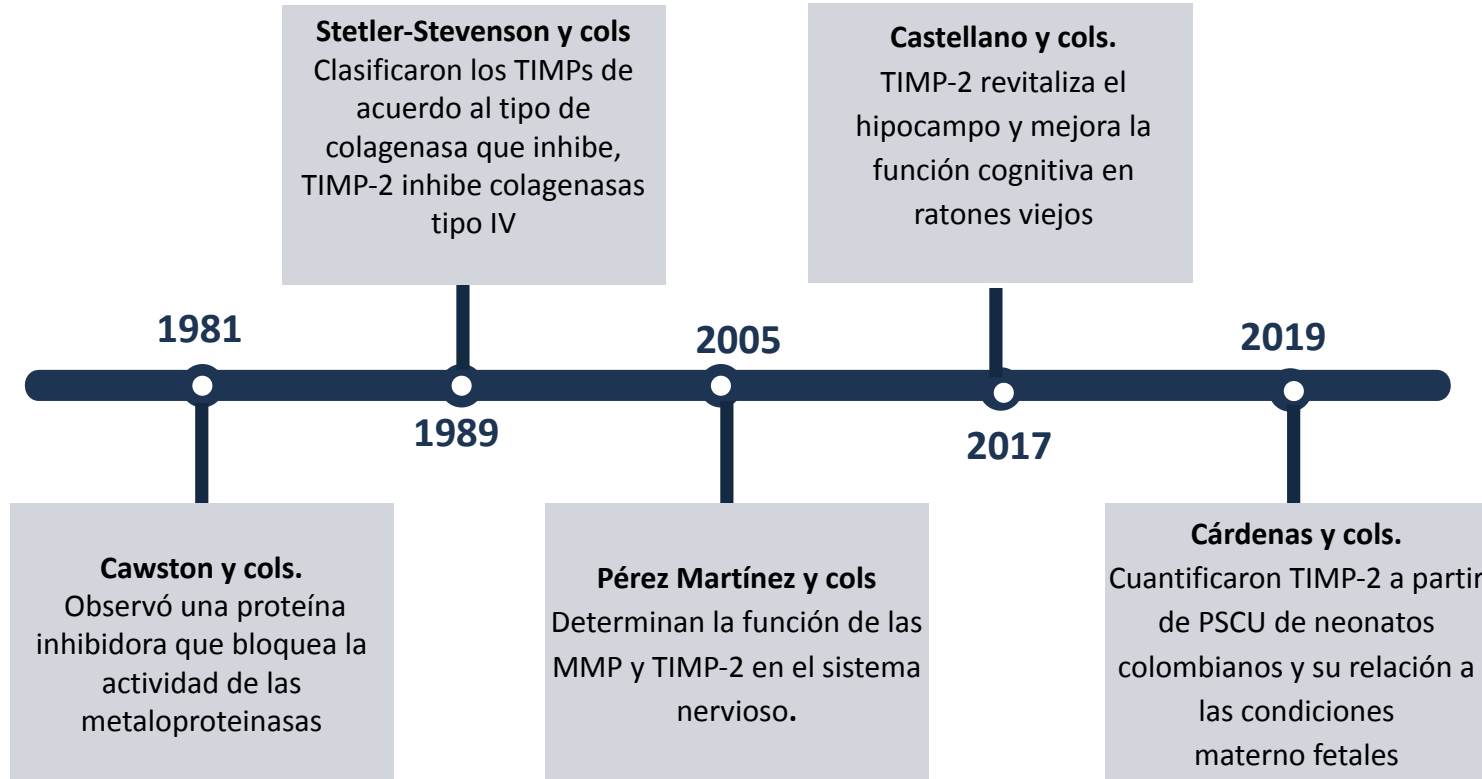
Objetivo general

Determinar la concentración de proteínas neuromoduladoras TIMP-2 y sgp130 presentes en el plasma de sangre de cordón umbilical (PSCU) de neonatos colombianos.

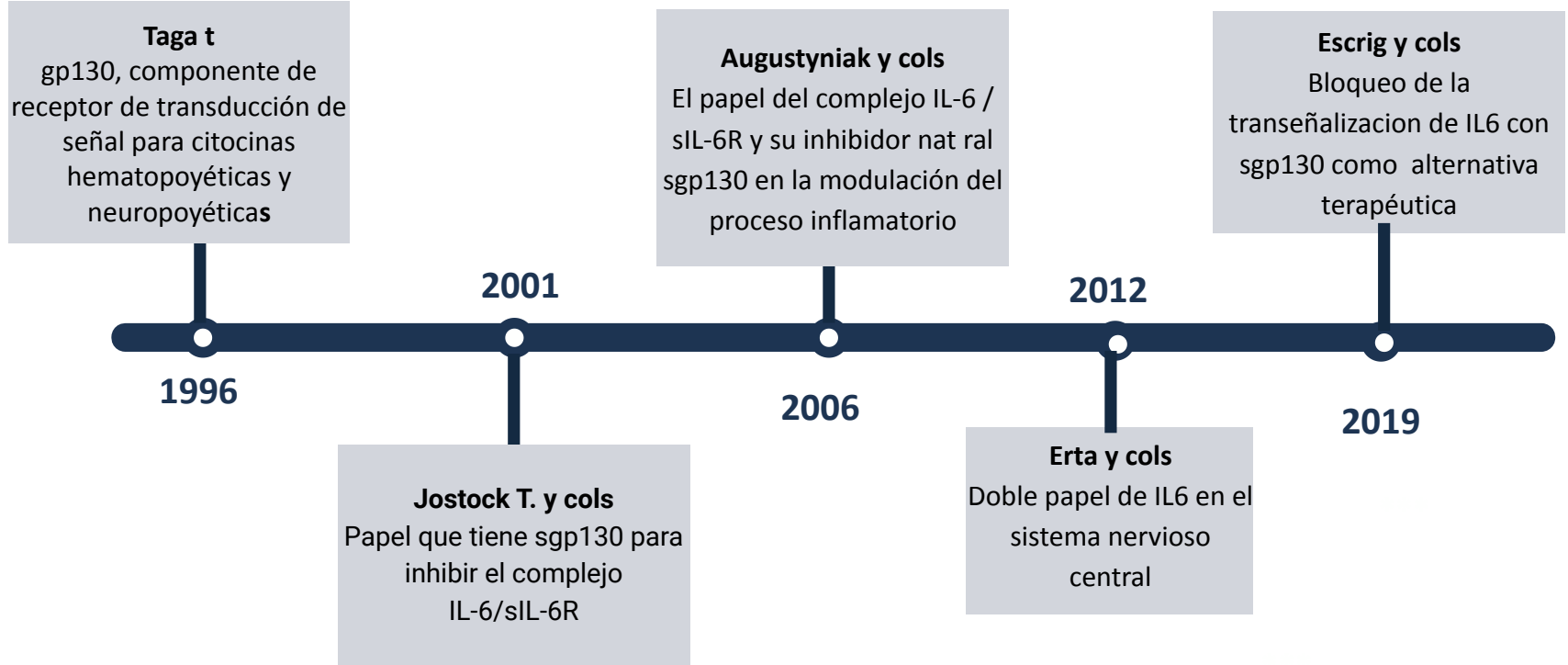
Objetivos específicos

- Cuantificar las proteínas TIMP-2 y sgp130 mediante la técnica de ELISA en PSCU de neonatos colombianos.
- Correlacionar las variables materno fetales con las concentraciones de las proteínas neuromoduladoras TIMP-2 y sgp130, presentes en el PSCU de neonatos colombianos.

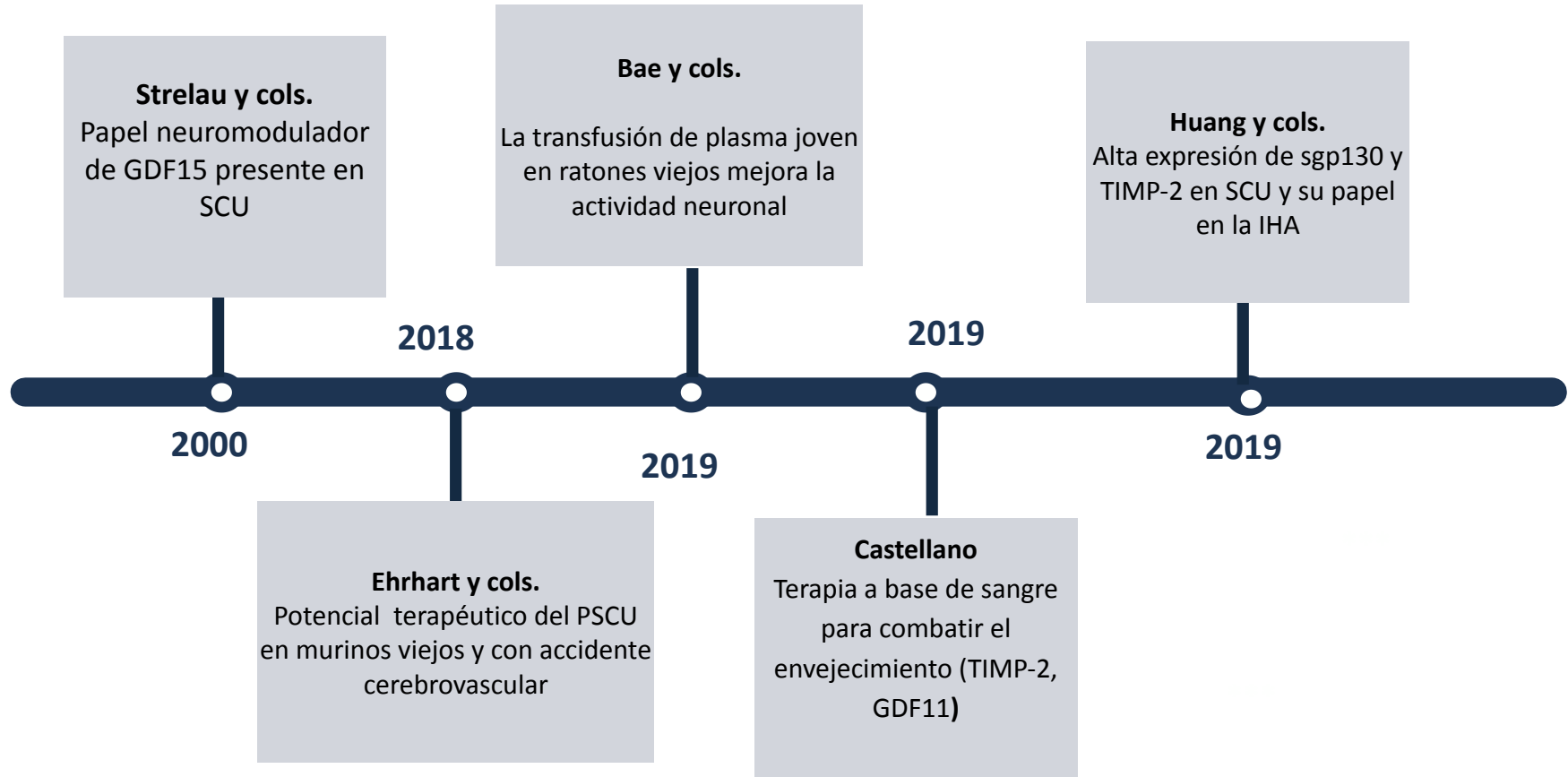
Línea de tiempo TIMP-2



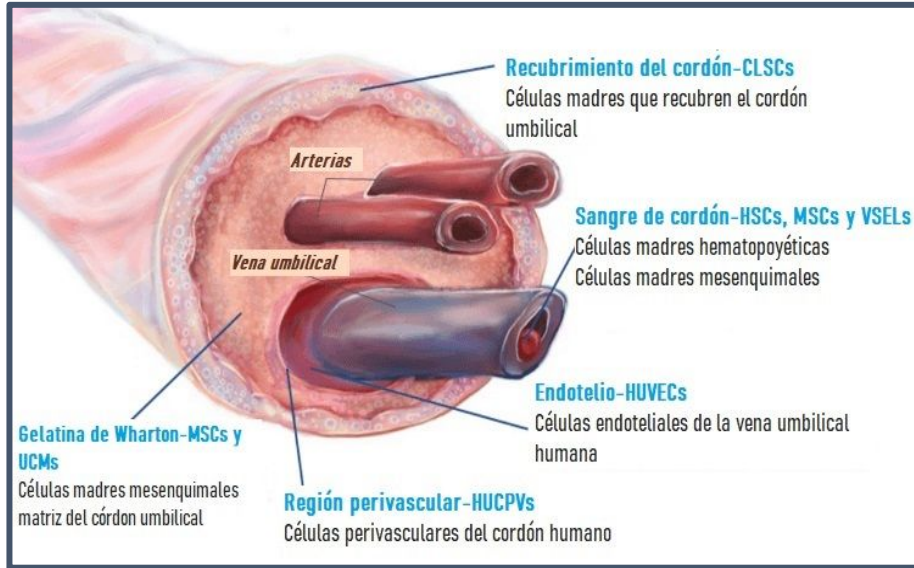
Línea de tiempo sgp130



Línea de tiempo SCU



Sangre de cordón umbilical



Ug" Sangre fetal obtenida de la vena del cordón umbilical, rica en células madre y factores de crecimiento.

Ug" La SCU es fundamental para el crecimiento y desarrollo fetal normal.

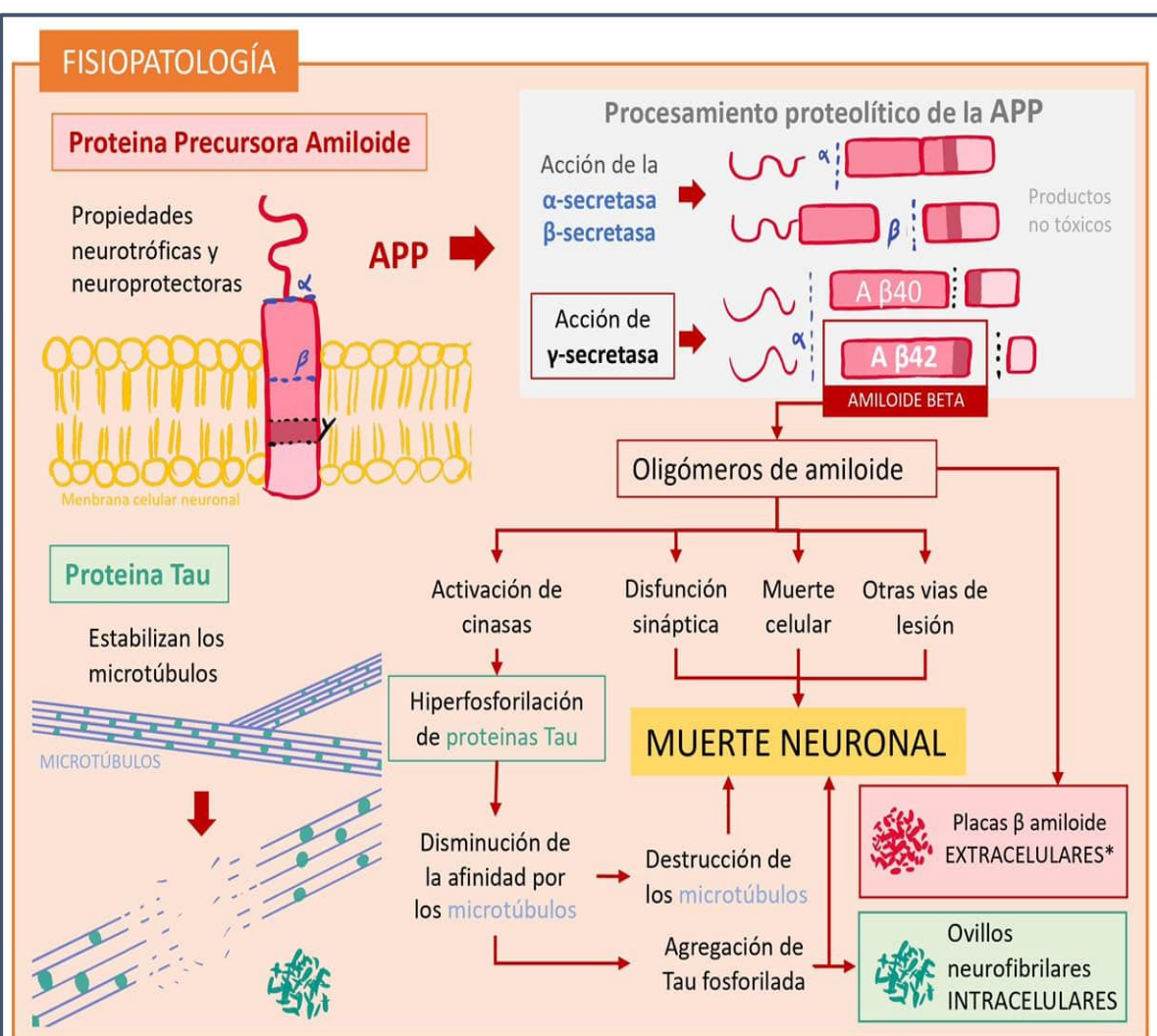
Ug" Investigación de sus componentes en Medicina regenerativa y del envejecimiento.

Ug" Proteínas neuromoduladoras aplicadas a enfermedades neurodegenerativas

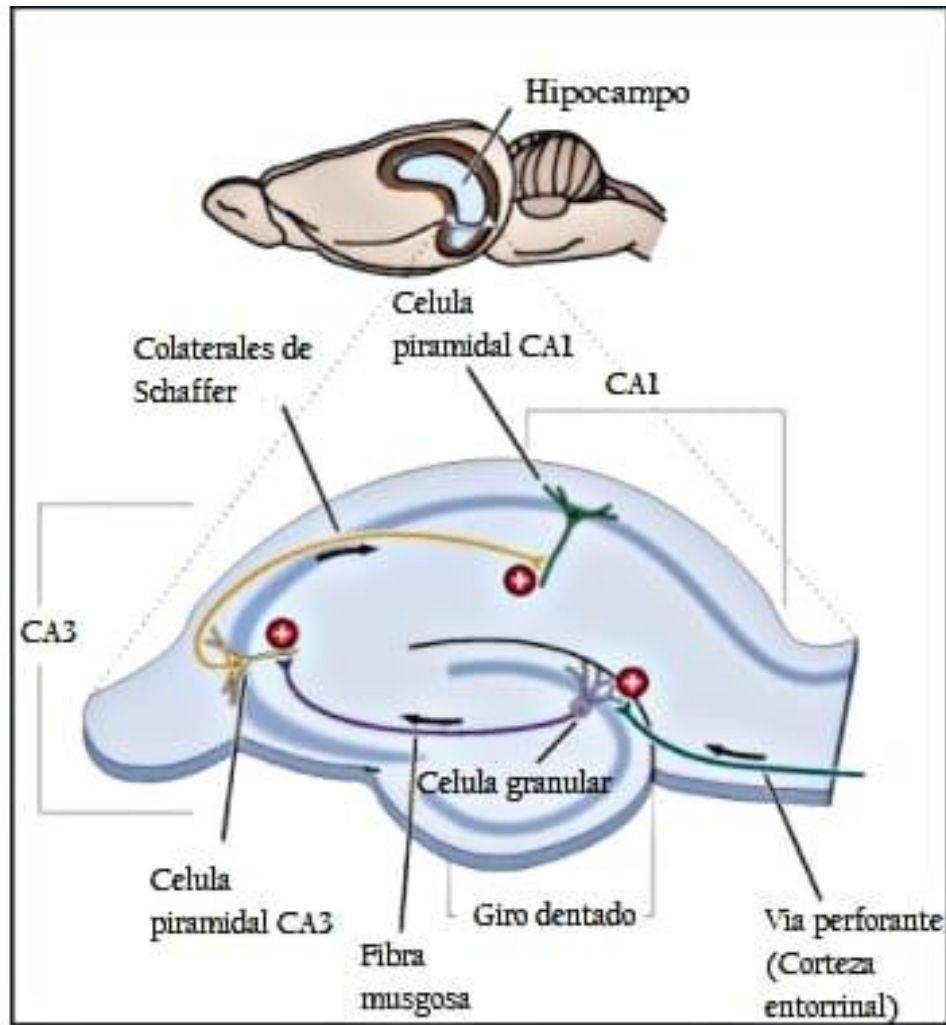
Ug" Ventajas de SCU frente a otras fuentes de células madre

Cordón Umbilical Partes. Cells4Life. [internet] Disponible en:
<https://cells4life.es/blog/sirven-las-celulas-madre-del-tejido-del-cordon-umbilical/cordon>

Enfermedad de Alzheimer

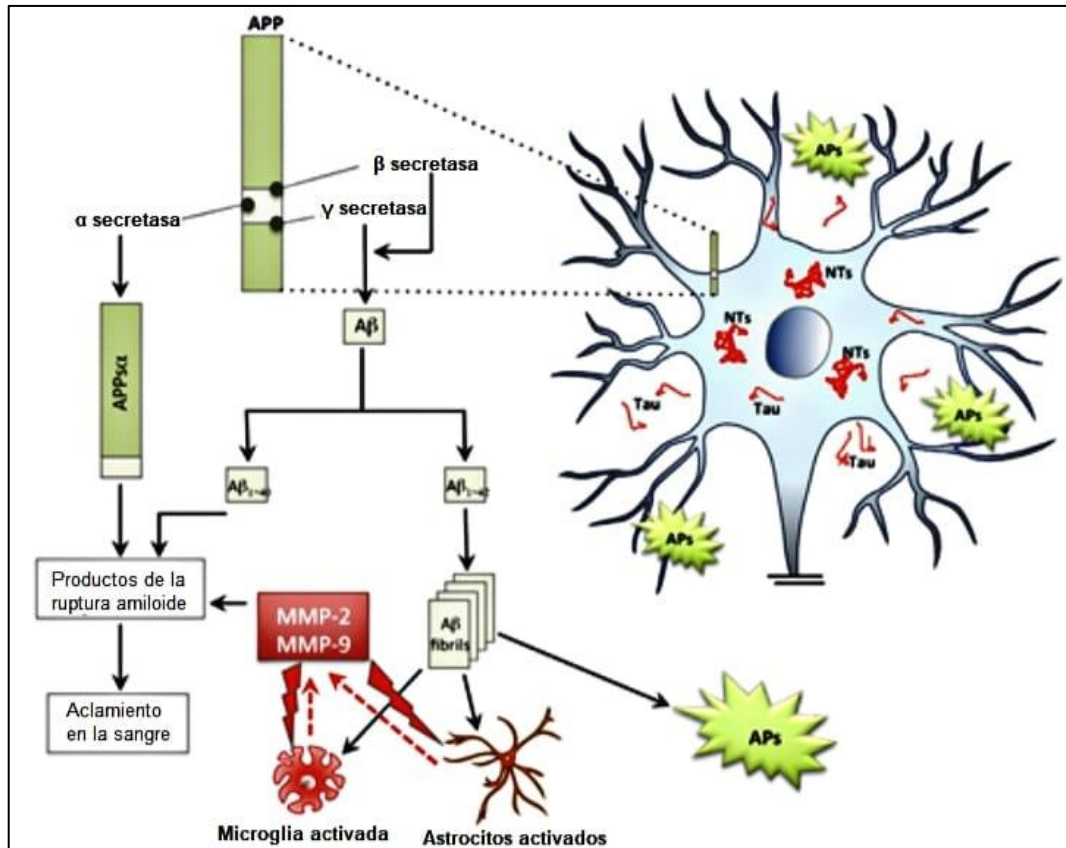


Hipocampo



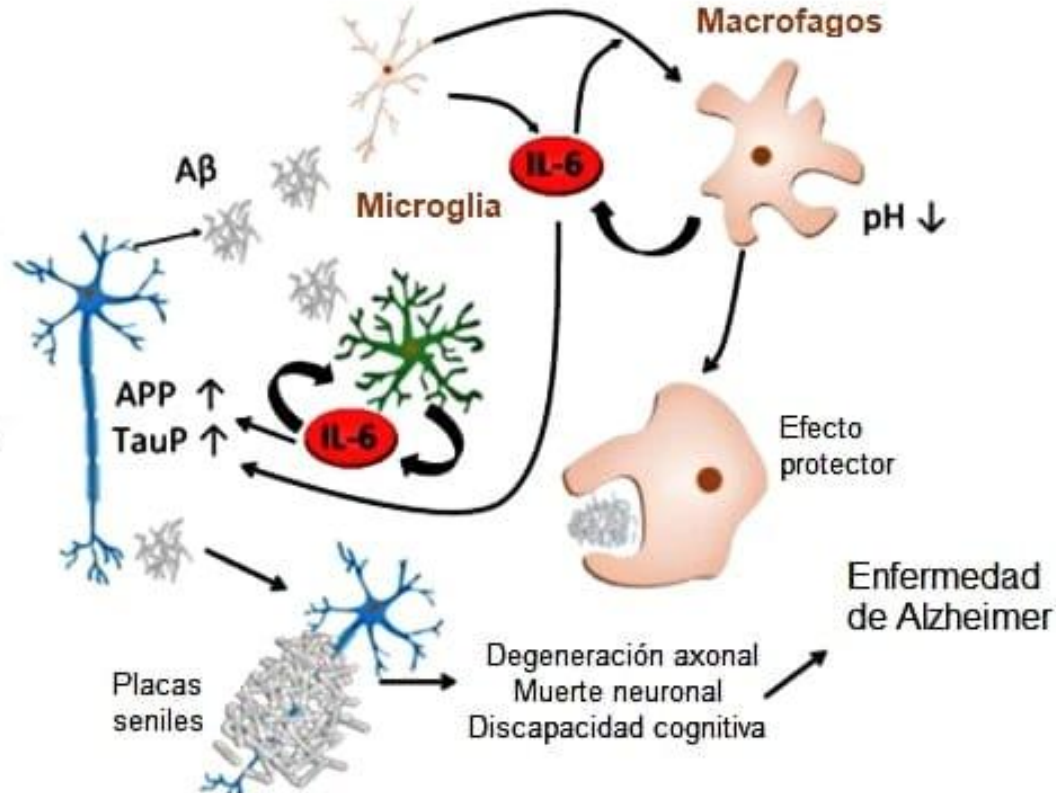
Robins y cols. Patología estructural y funcional. 9a edición. Enfermedades neurodegenerativas. Pag 1287-92.

Propiedades neuromoduladoras (TIMP-2)



Papel de MMP-2 y MMP-9 en la cascada amiloide de la enfermedad de Alzheimer. Imagen tomada de: https://www.researchgate.net/figure/Role-of-MMP-2-and-MMP-9-in-the-amyloid-cascade-of-Alzheimers-disease-The-amyloid_fig4_306268239

Propiedades neuromoduladoras (sgp130)



Materiales y Métodos

- Aprobado por el comité de ética en investigación del Hospital Militar Central
- Realizado en STEM Medicina Regenerativa

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ol style="list-style-type: none">1. Recién nacidos sanos que no presentaron complicaciones al nacer.2. Recuento de células nucleadas mayor a 400 millones en las muestras recolectadas.3. Volumen de muestra mínimo 40 mL de sangre.4. Tiempo entre la recolección y el procesamiento inicial menor a 36 horas.5. Tener crio preservadas las muestras de SCU en STEM Medicina Regenerativa.	<ol style="list-style-type: none">1. Recién nacidos prematuros.2. Plasma con pruebas infecciosas positivas.3. Plasma con pruebas microbiológicas positivas4. No firma el consentimiento informado.5. Muestras con datos del recién nacido y de madre incompletos.

Metodología

Muestra Poblacional



-Mujeres embarazadas de Colombia
en el año 2019-2020

-De 36 a 40 semanas de gestación

-Que se encuentren dentro del plan de
sangre de cordón umbilical ofrecido
por STEM Medicina Regenerativa

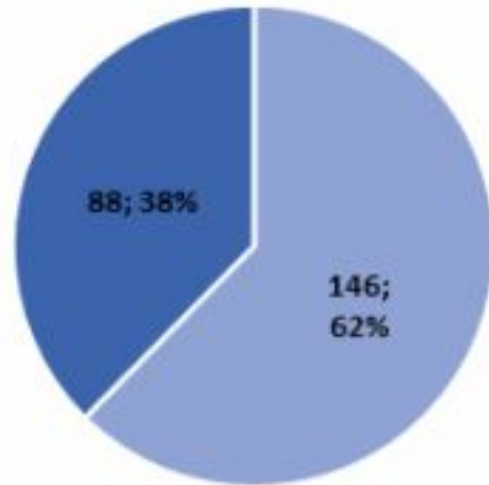


Metodología

Selección de las muestras

Total de muestras: 234

Las muestras debían cumplir con los datos exigidos y consentimiento informado



■ Criterios de inclusión ■ Criterios de exclusión

Metodología



$$n = \frac{N Z_{\alpha/2}^2 \sigma^2}{d^2 (N-1) + Z_{\alpha/2}^2 \sigma^2}$$

Cálculo de tamaño de muestra

Formula para calcular el tamaño de la muestra

n: Tamaño de la muestra

N: 146 datos (Población a partir de los criterios de inclusión)

Z: 1.96 (IC del 95%)

σ : 66.84 (Desviacion estandar)

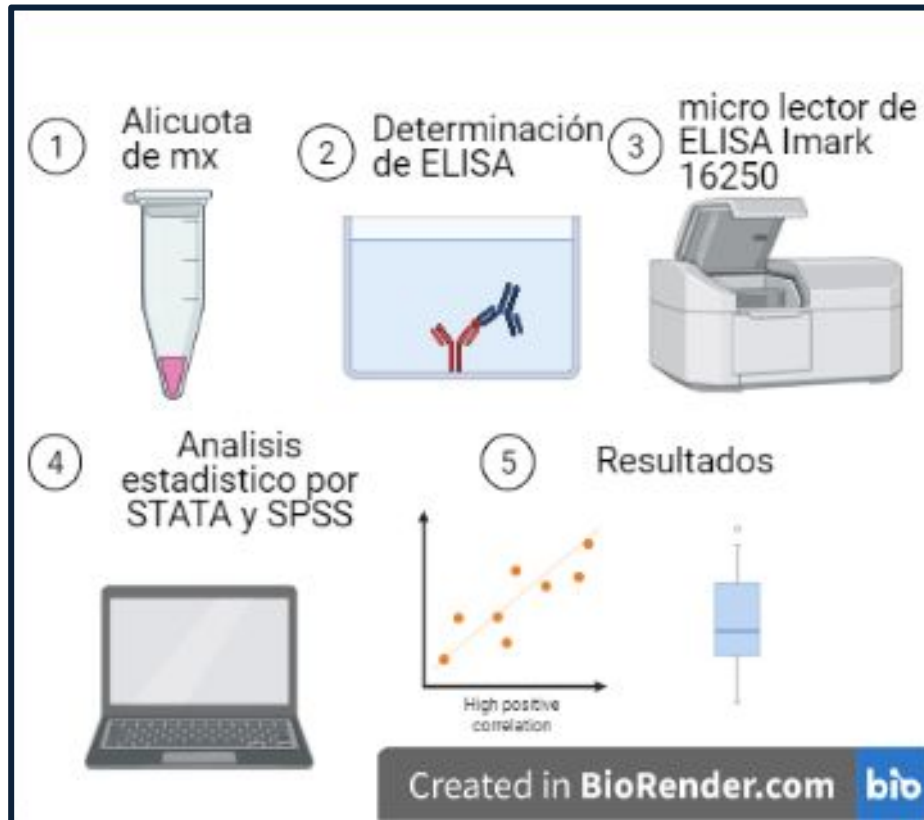
d: 5 (Error de estimación)

$$\frac{(146) \cdot (1.96 \hat{z}) \cdot (66.84 \hat{\sigma})}{(5 \hat{d}) \cdot (212-1) + (1.96 \hat{z}) \cdot (66.84 \hat{\sigma})} = 120.54$$



Selección de 121 datos en matriz por medio de **sistema de aleatoridad** a partir de los **146** datos

Metodología



Resultados y Discusión

Características de las SCU

Cárdenas y cols.

TIMP-2 = 97.73 pg/ml
CN= 9070 cells/ul

Nakatsukasa y cols.

sgp130 = 150-450 pg/ml

Huang y cols.

TIMP-2 = 10.463,1 ng/mg
sgp130 = 2008,8 ng/mg

Rodríguez y cols.

CN= 7138 cells/ul
CD34+ = 22.47 cells/ul

Chandra y cols.

CN= 7770 cells/ul

Variable	n	Media	SD	Mediana	Mínimo	Máximo
TIMP-2 (pg/ml)	121	100.1	105.4	56.9	1.9	485.7
sgp130 (pg/ml)	121	641.1	295.9	613.8	0	1595.7

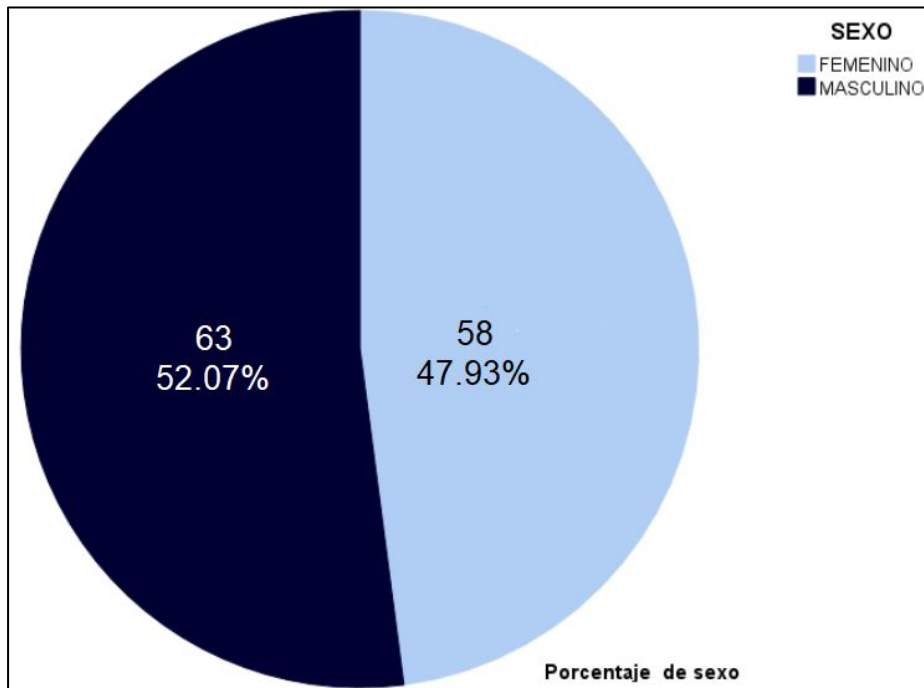
Variable	n	Media	SD	Mediana	Mínimo	Máximo
CD34+ (cell/ul)	121	97.14	74.53	76.95	9.24	403.81
Recuento de CN (cell/ul)	121	9469.4	4475.4	9000	3400	49800

Características de las SCU

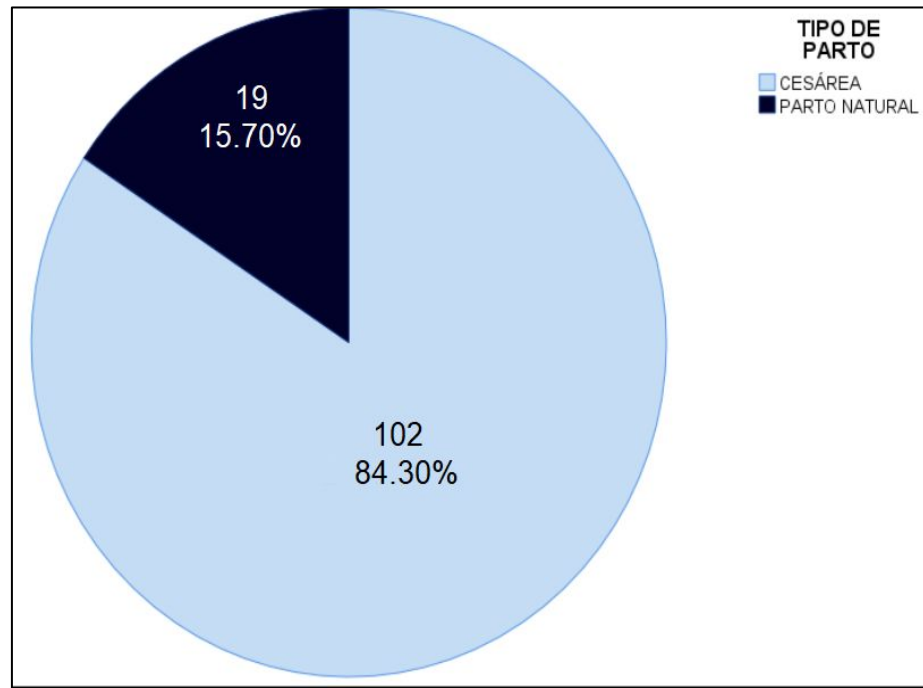
Variable	n	Media	SD	Mediana	Mínimo	Máximo
Volumen (ml)	121	86.7	24.6	86.8	42	239
Periodo gestacional (semanas)	121	38.5	1.01	39	34	40
Peso (gr)	121	3250.9	340.5	3270	1895	4300
Talla (cm)	121	49.9	2.45	50	40	56

Características de las SCU

Porcentajes del sexo de neonatos colombianos que ingresaron a STEM medicina regenerativa (2019-2020).



Tipo de nacimiento de los neonatos colombianos que ingresaron a STEM medicina regenerativa (2019-2020).



Test de normalidad de las variables materno fetales y el contenido de SCU

Pruebas de normalidad			
Kolmogorov-Smirnov			
Variable	Estadístico	n	Sig (p)
sgp130	,078	121	,069
TIMP-2	,213	121	<,001
VOL	,087	121	,024
RECUENTO CN	,182	121	<,001
CD34+/UL	,530	121	<,001
PESO	,102	121	,003
TALLA	,182	121	<,001
SEMANAS DE GESTACIÓN	,211	121	<,001

Distribución	
Paramétrica	$p > 0.05$
No paramétrica	$p < 0.05$

Correlaciones entre factores neonatales y el contenido de SCU

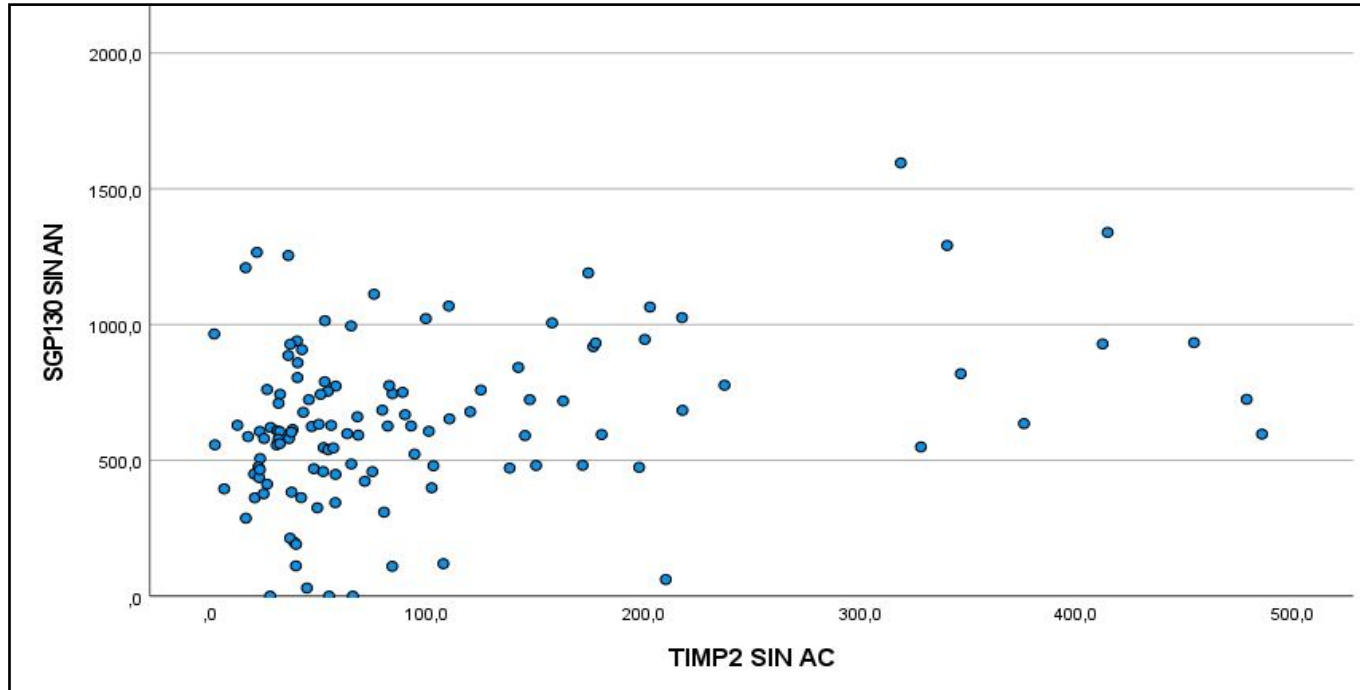
	<i>SGP130</i> <i>rho(p)</i>	<i>TIMP2</i> <i>rho(p)</i>	<i>Volumen</i> <i>rho(p)</i>	<i>CD34+</i> <i>rho(p)</i>
<i>SGP130</i>	1			
<i>TIMP2</i>	0.29 (0.009)	1		
<i>Volumen</i>	0.09(0.3)	0.14(0.10)	1	
<i>CD34+</i>	0.07(0.4)	0.10(0.23)	0.50(0.000)	1

<i>Rodríguez y cols.</i>	
<i>Variables</i>	<i>rho (p)</i>
<i>Volumen-CD34+</i>	0.71(0.015)

<i>Cárdenas y cols.</i>	
<i>Variable</i>	<i>rho (p)</i>
<i>CD34+-TIMP-2</i>	0.47(0.0001)
<i>Volumen-CD34+</i>	0.59(0.000)
<i>Volumen-CD34+</i>	0.59(0.000)

Correlación bilateral de variables entre TIMP-2 con sgp130

Correlación entre la concentración de TIMP-2 (pg/ml) y sgp130 (pg/ml) en las unidades de PSCU en neonatos colombianos que ingresaron a STEM medicina regenerativa (2019-2020)



Correlaciones entre factores neonatales y el contenido de SCU

	<i>SGP130 rho(p)</i>	<i>TIMP2 rho(p)</i>	<i>Volumen rho(p)</i>	<i>Recuento CN rho(p)</i>	<i>CD34+ rho(p)</i>	<i>Peso rho(p)</i>	<i>Talla rho(p)</i>
<i>Recuento CN</i>	-0.0063(0.9)	0.075 (0.4)	0.27 (0.002)	1			
<i>Peso</i>	-0.01(0.8)	0.09(0.29)	0.35(0.001)	0.106(0.24)	0.18(0.03)	1	
<i>Talla</i>	-0.02(0.75)	0.03(0.71)	0.21(0.021)	0.09(0.29)	0.11(0.21)	0.47(0.000)	1
<i>Edad gestacional</i>	0.04(0.66)	0.01(0.9)	0.09(0.3)	0.14(0.12)	-0.06(0.47)	0.29(0.004)	0.12(0.17)

<i>Cárdenas y cols.</i>	<i>rho (p)</i>	<i>Nakatsukasa y cols.</i>	<i>rho(p)</i>
Volumen-Recuento de CN	0.29(0.024)	Peso-sgp130	0.049(0.706)
Peso - TIMP-2	0.30 (0.019)		

Conclusiones



El presente trabajo es el primer estudio a nivel mundial que se realiza por un banco de sangre de cordón umbilical público o privado para la determinación de concentraciones de proteínas neuromoduladoras TIMP-2 (100.1 pg/mL) y de sgp130 (641.1 pg/mL) de PSCU en neonatos con el fin de establecer su uso terapéutico en futuras investigaciones.



Las proteínas TIMP-2 y sgp130 no se correlacionaron con las variables materno fetales analizadas, permitiendo inferir que dichas variables no intervienen en las concentraciones de estas proteínas.



Por último se espera que este proyecto contribuya en el desarrollo de una terapia para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Al conocer las concentraciones de dichas proteínas en este componente se busca postular a el PSCU como una fuente de proteínas neuromoduladoras.

Perspectivas futuras

Debido a las propiedades de ambas proteínas a nivel cerebral, este estudio proyecta una continuación donde se evalúe la dosis efectiva de TIMP-2 y sgp130 en la que se observe la disminución de las placas β -amiloides y la revitalización del hipocampo en líneas celulares y modelos murinos respectivamente, para así poder llegar a una terapia consolidada con el PSCU.

Muchas Gracias

Referencias

- Cawston TE, Galloway WA, Mercer E, Murphy G, Reynolds JJ. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochem J* [Internet]. 1981;195(1):159–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1162866/pdf/biochemj00402-0164.pdf>
- Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* [Internet]. 1989;264(29):17374–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71503-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71503-2)
- Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, McBride AA, James ML, Berdnik D, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature* [Internet]. 2017;544(7651):488–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5586222/>
- Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2004;49(3):187–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842803002749>
- Pérez-Martínez L, Jaworski DM. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci* [Internet]. 2005;25(20):4917–29. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/25/20/4917.full>
- Cardenas V, Guevara L. 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; 2019.

Referencias

- Taga T. gp130, A shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* [Internet]. 1996;67(1):1–10. Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666978>
- Jostock T, Müllberg J, Özbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* [Internet]. 2001;268(1):160–7. Available from:<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x?sid=nlm%3Apubmed>
- Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Basiewicz-Worsztynowicz B, Jankowski A. The role of IL-6/sIL-6R complex and its natural inhibitor sgp130 in modulation of inflammatory process. *Postepy Biochem* [Internet]. 2006;52(2):194–203. Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17078509>
- Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2012;8(9):1254–66. Available from:<https://www.ijbs.com/v08p1254.htm>
- Escrig A, Canal C, Sanchis P, Fernández-Gayol O, Montilla A, Comes G, et al. IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physio-pathological phenotype of the Tg2576 and 3xTgAD mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2019;82:145–59. Available from:<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.08.005>

Referencias

- Strelau J, Sullivan A, Bottner M, Lingor P, Falkenstein E, Suter-Crazzolara C, et al. Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* [Internet]. 2000;20(23):8597–603. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6773071/>
- Ehrhart J, Sanberg PR, Garbuzova-Davis S. Plasma derived from human umbilical cord blood: Potential cell-additive or cell-substitute therapeutic for neurodegenerative diseases. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018;22(12):6157–66. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6237605>
- Huang YJ, Lee CY, Cao J, Lee HS, Chang CH, Chen P Da, et al. Therapeutic Potential of Plasma Proteins Derived from Umbilical Cord Blood for Acute Liver Failure. *Mol Pharm* [Internet]. 2019;16(3):1092–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30698974/>
- Bae SH, Jo A, Park JH, Lim CW, Choi Y, Oh J, et al. Bioassay for monitoring the anti-aging effect of cord blood treatment. *Theranostics* [Internet]. 2019;9(1):1–10. Available from: doi:10.7150/thno.30422
- Castellano JM. Blood-Based Therapies to Combat Aging. *Gerontology* [Internet]. 2019;65(1):84–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6335155/>