



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EFFECTO DE LA HIPERGLICEMIA EN LA
PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES DE CORDÓN
UMBILICAL DE HIJOS DE MADRES
NORMOGLICÉMICAS Y DIABÉTICAS.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA:

Sandra Rocío Cruz Bárcenas

TUTOR:

Dr. José Romo Yáñez

Dra. Patricia Ramírez Noguera



Cuautitlán Izcalli, Estado de Mexico, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Efecto de la hiperglicemia en la proliferación y apoptosis de células troncales mesenquimales de cordón umbilical de hijos de madres normoglicémicas y diabéticas.

Que presenta la pasante: **Sandra Rocío Cruz Bárcenas**
Con número de cuenta: **309055350** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Reconocimientos

El presente proyecto fue elaborado en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), en el departamento de Genética y Genómica Humana bajo la dirección del Dr. en C. José Romo Yáñez. Sin embargo, el apoyo del Dr. Ismael Mancilla Herrera, Dr. Enrique Reyes, Dra. Patricia Grether González y Dra. Mónica Aguinaga del departamento de Genética y Genómica Humana fue imprescindible para la realización del mismo. No. de registro del proyecto: 3140-21202-01-15.



“No hablar sobre ciencia me parece perverso. Cuando uno se enamora, se lo quiere gritar al mundo.” Carl Sagan

*Gracias a Dios por guiar mis pasos con sabiduría y misterio.
Gracias infinitas a mi familia por darme el ejemplo de tenacidad, trabajo y éxito. A mis padres, José Luis y Micaela, porque aunque en muchos momentos parece que estuviéramos en una batalla, me han apoyado en todo momento. A mis hermanas: Araceli, Alejandra, Gabriela por confiar en mí y compartir mis alegrías. Especialmente a Leticia por estar en las buenas, excelentes, malas y peores; por permanecer, por escucharme, por obligarme a ser mejor persona y principalmente por apoyar y compartir cada una de mis locuras. A mis bebés, Alfredo y Joaquín, por iluminar mis días con sólo ver sus hermosas caritas.*

A las personas que por gusto han estado a mi lado: Angélica, Marisol y Karina, gracias por hacer del trabajo en equipo algo tan divertido, juntas de inicio a fin, en la vida y en la cancha. A Ricardo, Ignacio y Eliseo por compartir tantos círculos de estudios, comida chatarra, fiestas y risas al por mayor. A Diana y Josiff por ser mis amigos y maestros al mismo tiempo, por hacer que el laboratorio fuera especialmente divertido. A Cristina, infinitas gracias por hacer que mis “ahorita” sean un “ya lo hice”, gracias por darme todo lo que eres, por estar a mi lado y darme una sonrisa cada que la necesito, gracias por absolutamente todo.

Al Dr. José Romo por su paciencia y por darme la oportunidad de ser parte de éste hermoso proyecto. Al Instituto Nacional de Perinatología, principalmente al laboratorio de Genética y Genómica Humana, así como a todos los doctores, compañeros y personas que conocí al estar allí.

A todas las personas que de una u otra manera se cruzaron en mi camino y pusieron un granito de arena a éste trabajo o a su servidora para poder lograrlo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C1 por darme la oportunidad de ser parte de ésta hermosa institución, además de darme experiencias, conocimientos, valores, lecciones, amistad, ilusiones, amor, fortaleza, diversidad, orgullo, felicidad y memorias que llevaré toda la vida.

*Por mi raza hablará el espíritu...
¡MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!
¡GOYA! ¡GOYA!
¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!
¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!
¡GOYA!
¡¡UNIVERSIDAD!!
¡¡GRACIAS TOTALES!!!*

Declaración de autenticidad

Por la presente declaro que, salvo cuando se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente para su consideración para cualquier otro título o grado en esta o cualquier otra Universidad. Esta tesis es resultado de mi propio trabajo y no incluye nada que sea el resultado de algún trabajo realizado en colaboración, salvo que se indique específicamente en el texto.

Sandra Rocío Cruz Bárcenas. Cuautitlán Izcalli, Estado de Mexico, 2018

Índice general

Abreviaturas	XI
Índice de figuras	XV
Índice de tablas	XIX
1. Presentación	1
1.1. Presentación	1
1.2. Hipótesis	2
1.3. Objetivo general	2
1.3.1. Objetivos particulares	2
2. Marco teórico	5
2.1. Diabetes	5
2.1.1. Epidemiología	7
2.1.2. Diabetes en el embarazo	9
2.1.2.1. Malformaciones congénitas y factores genéticos	11
2.1.3. Epigenética	15
2.2. Embriogénesis	16
2.3. Células Troncales	21
2.3.1. Origen	22
2.3.2. Clasificación	23
2.3.3. Células troncales mesenquimales de cordón umbilical humano	23
2.3.3.1. Gelatina de Wharton	24
2.3.3.2. Caracterización celular	26
2.3.4. Aplicaciones de la células troncales mesenquimales	29
3. Metodología de experimentación	31
3.1. Aislamiento de células troncales mesenquimales de la gelatina de Whar- ton de cordón umbilical humano.	31
3.1.1. Cultivo primario	31
3.1.2. Inmunofenotipificación de hWJMSC por citometría de flujo	32
3.1.3. Selección de hWJMSC por FACS	33

ÍNDICE GENERAL

3.2.	Análisis de proliferación de hWJMSC	33
3.2.1.	Análisis de proliferación de hWJMSC con glucosa	34
3.3.	Diferenciación neural	34
3.3.1.	Inmunofluorescencia indirecta	35
3.3.2.	Expresión de genes	36
3.3.2.1.	Síntesis de cDNA	36
3.3.2.2.	Expresión relativa de genes de troncalidad y diferenciación neural por RT-PCR	37
3.3.2.3.	Electroforesis en gel de agarosa	38
3.4.	Diferenciación Adipogénica	38
3.4.1.	Tinción <i>Oil Red O Solution</i>	38
3.4.2.	Expresión de genes de diferenciación adipogénica	39
3.5.	Diferenciación Osteogénica	39
3.5.1.	Tinción con <i>Alizarin Red S</i>	40
3.6.	Análisis de apoptosis por citometría de flujo	40
3.7.	Expresión de genes proapoptóticos y de estrés oxidativo mediante RT-PCR	41
3.8.	Tratamiento de datos	42
4.	Resultados	43
4.1.	Aislamiento y cultivo celular	43
4.2.	Caracterización, clasificación y enriquecimiento de las hWJMSC	44
4.3.	Proliferación celular	46
4.4.	Diferenciación neural de hWJMSC	50
4.5.	Diferenciación adipogénica de hWJMSC	54
4.6.	Diferenciación osteogénica de hWJMSC	54
4.7.	Apoptosis de hWJMSC	56
4.8.	Expresión de genes proapoptóticos y de estrés oxidativo	57
5.	Análisis de Resultados	59
6.	Conclusiones	69
7.	Perspectivas	71
	Referencias	73

Abreviaturas

Roman Symbols

ADAM10 *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*, Desintegrina y proteína que contiene el dominio metaloproteinasa 10, page 13

ADSNC Anomalías en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, page 4

AGE *Advanced glycation end products*. Productos finales de glicación avanzada, page 15

AGL Ácidos Grasos Libres, page 9

AMPK *AMP-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por AMP, page 13

APC Aloficocianina, page 32

ASK1 *Apoptosis signal-regulating kinase 1*. Apoptosis reguladora de la señal quinasa 1, page 15

ATP *Adenosine Triphosphate*, Adenosín Trifosfato, page 6

BCL-XL *B-cell lymphoma-extra large*, Linfoma extra grande de células B, page 14

BCL2 *B-cell lymphoma 2*, Linfoma de células B 2, page 14

BHT Butilhidroxitolueno, page 13

BID *BH3 interacting-domain death agonist*, Agonista de muerte del dominio de interacción BH3, page 14

BM *Bone marrow*, Médula ósea, page 22

BNIP3 *BCL2 interacting Protein 3*, Proteína interactiva con BCL2, page 14

BSA *Bovine serum albumin*, Albúmina de suero bovino, page 35

CAPN10 *Calpain 10*, Calpeína 10, page 6

CD *Cluster of differentiation*, Cúmulo de diferenciación, page 3

ÍNDICE GENERAL

- cDNA** DNA complementario, page 36
- CG** *Chorionic gonadotropin*, Gonadotropina coriónica, page 17
- CTN** Células Troncales Neurales, page 13
- CY** Cianina, page 32
- dL** decilitro = 100mililitros, page 7
- DM** Diabetes Mellitus, page 4
- DM1** Diabetes Mellitus tipo 1, page 5
- DM2** Diabetes Mellitus tipo 2, page 5
- DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle's medium*, Medio modificado Dulbecco Eagle, page 34
- DMG** Diabetes Mellitus Gestacional, page 5
- DNA** *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico, page 15
- DTN** Defectos del Tubo Neural, page 11
- EDTA** *Ethylenediaminetetraacetic acid*, Ácido etilendiaminotetraacético, page 33
- ESC** *Embryonic Stem Cells*, Células troncales embrionarias, page 23
- FACS** *fluorescence-activated cell sorter*, Clasificador celular activado por fluorescencia, page 34
- FGFb** *Basic fibroblast growth factor*, Factor de crecimiento de fibroblastos básico, page 26
- FITC** Isotiocianato de fluoresceína, page 32
- FTO** *Fat mass and obesity-associated protein/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase*, Proteína asociada a obesidad y grasa/dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato, page 16
- GSH** Glutación, page 13
- GWAS** *Genome-Wide Association Study*, Estudios de asociación al genoma completo, page 6
- HbA_{1c}** Hemoglobina glucosilada A_{1c}, page 7
- HIF1 α** *Hypoxia Inducible Factor 1 α* , subunidad α del factor 1 inducible por hipoxia, page 13
- HSC** *Hematopoietic Stem Cells*, Células troncales hematopoyéticas, page 23

- hUCWJMSC** *Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells from human umbilical cordon*, Células troncales mesenquimales de cordón umbilical humano, page 2
- IDF** *International Diabetes Federation*, Federación Internacional de Diabetes, page 7
- IFN γ** Interferon γ , page 27
- IGF2** *Insulin-like growth factor 2*, Factor de crecimiento insulínico tipos 2, page 14
- IL** *Interleukin*, Interleucina, page 27
- IMC** Índice de masa corporal, page 11
- IRS1** *Insulin receptor substrate 1*, Sustrato del receptor de insulina 1, page 16
- ISCT** *International Society Cellular Therapy*, Sociedad Internacional de Terapia Celular, page 23
- JNK1/2** *c-Jun N-terminal protein kinase 1/2*, proteína quinasa c-Jun N-terminal 1/2, page 15
- KAISO** Miembro de la familia de proteínas con dedos de zinc BTB/POZ, page 16
- KCNJ11** *Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11*, Canal de potasio dependiente de voltaje subfamilia J miembro 11, page 6
- KCNQ1** *Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1*, Miembro 1 de la subfamilia de canales de potasio cerrados de voltaje, page 16
- MAP2** *Microtubule-associated protein 2*, Proteína asociada a microtúbulos 2, page 3
- MBD1-4** *Methyl CpG binding domain protein 1-4*, Proteína del dominio de unión a metilo CpG, page 16
- MECP2** *Methyl CpG binding protein 2*, Proteína de unión a metil CpG 2, page 16
- mg** miligramos, page 7
- mM** milimolar, mol/m³, page 7
- MSC** *Mesenchymal Stem Cells*, Células Troncales Mesenquimales, page 22
- NAPDH** *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced*, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, page 15
- NES** Nestina, page 3
- NSC** *Neural stem cells*, Células troncales neurales, page 2
- NTD** *Neural Tube Defects*, Defectos del tubo neural, page 2

- Pax3** *Paired box gene 3*, page 12
- PBS** *Phosphate buffered saline*, Buffer fosfato salino, page 33
- PDGFRA** *Platelet-derived growth factor receptor A*, Receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, page 13
- PE** Ficoeritrina, page 32
- PIB** Producto Interno Bruto, page 9
- PKC** *Protein kinase C*, Proteína quinasa C (PKC α , PKC β II y PKC γ), page 15
- PPAR γ** *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas, page 3
- RNA** *Ribonucleic acid*, Ácido ribonucleico, page 16
- ROS** *Reactive Oxygen Species*, Especies reactivas de oxígeno, page 11
- rpm** Revoluciones por minuto, page 33
- SAGE** *Serial Analysis of Gene Expression*, Análisis en serie de la expresión génica, page 26
- SNC** Sistema Nervioso Central, page 3
- SOX2** *Sex determining region Y-box 2*, Región Y determinante del sexo 2, page 3
- TCF7L2** *Transcription factor 7-like*, Factor de transcripción 7 y 2, page 6
- TFRC** *Transferrin receptor*, Receptor de transferrina, page 13
- TGF β 2** *Transforming growth factor β 2*, Factor de crecimiento transformante β 2, page 14
- TGF β r1** *Transforming growth factor β receptor 1*, Receptor al factor de crecimiento transformante, page 13
- TNF** *Tumor necrosis factor*, Factor de necrosis tumoral, page 27
- Tub β III** Tubulina β III, page 3
- TWSG1** *Twisted gastrulation protein homolog 1*, Proteína homóloga de gastrulación retorcida, page 13
- UCB** *Umbilical cordon blood*, Sangre de cordón umbilical, page 22
- VCL** *Vinculin*, Vinculina, page 13
- VLDL** *very low-density lipoprotein*, lipoproteínas de baja densidad, page 9
- WJ** *Wharton's jelly*, Gelatina de Wharton, page 25

Índice de figuras

2.1. <i>Mapa de % de prevalencias ajustadas a la edad de 20-79 años.</i> Mapa de América del Norte y Caribe indicando mediante tonalidad de colores los porcentajes de prevalencia de Diabetes, observando que México es el más alto con 15.8% [IDF, 2015]	8
2.2. <i>Acción diabetogénica producida en el embarazo.</i> Hormonas y citoquinas producidas por placenta y su efecto en el cuerpo de la madre. [Araya, 2009]	10
2.3. <i>Mecanismo por el cual la hiperglicemia conduce a las dismorfogénesis.</i> AMPK: AMP-dependiente de cinasa, GSH:GLutación reducido, H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno, AO: Antioxidante, O_2 : Radical superóxido, p53: gen supresor tumoral. [Clapés et al., 2013].	12
2.4. <i>Genes afectados en embriones por diabetes materna clasificados según su función.</i> [Pavlinkova et al., 2009]	14
2.5. <i>Proceso de fecundación, segmentación e implantación del blastocisto.</i> [Ferres et al., 2017]	18
2.6. <i>Representación del embrión trilaminar y el tejido al que da origen cada lamina germinal.</i> [Ferres et al., 2017]	19
2.7. <i>Desarrollo embrionario y fetal por semanas y organogénesis</i> [Dumm, 2003]	21
2.8. <i>Anatomía del cordón umbilical.</i> Corte transversal de cordón umbilical humano, observando la existencia de dos arterias y una vena [Batsali et al., 2013]	24
2.9. <i>Marcadores expresados por BM-MSC y UC-MSC derivados de WJ y la zona perivascular</i> [Batsali et al., 2013]	28
4.1. <i>Morfología de células aisladas de WJ de cordón umbilical humano, cultivadas en medio CHANG suplementado con antibiótico y fungizona, incubadas a condiciones estándar. (a)</i> Migración espontánea de las células del tejido a la superficie plástica. <i>(b)</i> Cultivo primario en desarrollo después de retirar los explantes de tejido, observando la morfología fibroblástica biespiculada. <i>(c)</i> Cultivo confluyente en monocapa y tejido.	43

4.2.	<i>Caracterización celular con tinción sencilla de marcadores de superficie por citometría de flujo.</i> Los gráficos muestran en color gris la autofluorescencia de las células correspondiente al fluoróforo usado; en azul se muestra la emisión de fluorescencia del anticuerpo correspondiente; los porcentajes indican el promedio de expresión y desviación estándar del marcador correspondiente; R1 muestra la región que indica el margen para determinar la positividad del marcaje sencillo, el cual se estableció previamente. $n=6$, número de eventos=100,000.	44
4.3.	<i>Caracterización de las subpoblaciones en células de gelatina de Wharton.</i> A) Selección de la población celular mediante tamaño y complejidad. B) Identificación por marcaje doble con CD34 y CD45 de la presencia de dos subpoblaciones celulares coexistentes, en color azul CD34 ⁺ (56 %) y color naranja CD34 ⁻ (40 %). C) Caracterización de ambas poblaciones celulares con los marcadores positivos CD13, CD73, CD90 y CD105.	45
4.4.	<i>Curva de proliferación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas in vitro.</i> En color negro se representan las hWJMSC normoglicémicas o control y, en color rosa las hWJMSC diabéticas. ● representa al medio CHANG, ■ al medio DMEM y ▲ al medio DMEMF12. * Diferencia estadística, DMEM vs CHANG/DMEMF12. ** Diferencia estadística, normoglicémicas vs diabéticas. ANOVA, $\alpha \leq 0.05$	47
4.5.	<i>Curvas de proliferación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas con diferentes concentraciones de glucosa en medio CHANG.</i> Observando que en las hWJMSC normoglicémicas el comportamiento es inversamente proporcional a la concentración mientras que en las hWJMSC diabéticas la proliferación se modifica pero la tendencia a disminuir la proliferación conforme se aumenta la concentración de glucosa permanece.	48
4.6.	<i>Tiempos de duplicación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas in vitro.</i> Gráfica de tiempos de duplicación promedio de hWJMSC <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo: CHANG, DMEM y DMEMF12. En color negro se representan las hWJMSC normoglicémicas o control y, en color rosa las hWJMSC diabéticas. * Diferencia estadística, DMEM vs CHANG/DMEMF12. ANOVA, $\alpha \leq 0.05$	48
4.7.	<i>Diferenciación neural de hWJMSC.</i> (a) Cultivo de hWJMSC control negativo a 100x. (b) Cultivo de hWJMSC con 3 días de pre-tratamiento con β FGF y 14 días con Forskolina a 100x. (c) Célula diferenciada que muestra claramente la morfología tipo neural con prolongaciones citoplasmáticas delgadas ramificadas a 400x.	50

4.8. <i>Expresión y cuantificación semicuantitativa de marcadores de troncalidad y diferenciación neural temprana por RT-PCR. (a)</i> Expresión en gel de agarosa de genes de troncalidad SOX2, Nestina y marcadores de diferenciación neural TUB β III, MAP2 a los 0, 3 (pre-tratamiento), 7 y 14 días de inducción neural. (B) Gráfica de expresión relativa de genes de troncalidad y diferenciación neural temprana a través de los días de diferenciación.	51
4.9. <i>hWJMSC sin inducción neural. (a)</i> Expresión positiva de Nestina en color rojo (Alexa Fluor 594). (b) Expresión positiva de Tubulina β III en color verde (Alexa Fluor 488). (c) Compilación de expresión de DAPI, Nestina y Tubulina β III. (d) Expresión positiva de SOX2 en rojo (Alexa Fluor 594). (e) Expresión positiva de Tubulina β III en verde (Alexa Fluor 488). (f) Compilación de expresión de DAPI, SOX2 y Tubulina β III. 100x	52
4.10. <i>hWJMSC con inducción neural. (a)</i> Expresión positiva de MAP2 en rojo (Alexa Fluor 594). (b, e, h, k) Expresión positiva de Tubulina β III en verde (Alexa Fluor 488). (c) Compilación de expresión de DAPI, MAP2 y Tubulina β III. (d) Expresión positiva de Nestina en rojo (Alexa Fluor 594). (f) Compilación de expresión de DAPI, Nestina y Tubulina β III. (g) No expresión de SOX2. (i) Compilación de expresión de DAPI y Tubulina β III. (j) Expresión positiva de TH en rojo (Alexa Fluor 594). (l) Compilación de expresión de DAPI, TH y Tubulina β III. 100x	53
4.11. <i>Diferenciación adipogénica de hWJMSC (a)</i> Células en medio Mesent-Cult basal a 40x, sin cambio. (B) Células en medio suplementado con diferenciador adipogénico, destacando los depósitos de lípidos característicos de los adipocitos, a 40x. (C) Células diferenciadas con tinción de rojo oleoso O, destacando los depósitos de lípidos teñidos de color rojo, a 40x. (D) Gel de agarosa con los productos de la RT-PCR mostrando mediante bandas la expresión del gen β -Actin y PPAR γ en hWJMSC control negativo, células de la gelatina de Wharton y células con inducción de diferenciación adipogénica. (E) Gráfica de barras mostrando el aumento de la expresión relativa de PPAR γ por RT-PCR.	55
4.12. <i>Diferenciación osteogénica de hWJMSC. (a)</i> Cultivo de hWJMSC control negativo teñido con Alizarina a 100x. (b) Cultivo de hWJMSC después de inducción osteogénica, teñido con Alizarina a 100x. Observando que la mineralización en el cultivo se tiñe de color rojo.	56
4.13. <i>Apoptosis en hWJMSC diabéticas y normoglicémicas.</i> Gráfica de barras que muestra el porcentaje de apoptosis de hWJMSC normoglicémicas y diabéticas con tratamientos de 40mM D-glucosa a 2 y 24 horas, además de un tratamiento con 40mM su respectivo control.	57

4.14. *Gráficas de barras de expresión relativa de genes pro-apoptóticos y asociados al estrés oxidativo.* Las barras negras ejemplifican hWJMSC de hijos de madres no diabéticas y las barras rosas de madres diabéticas. El primer par de barras por gráfica muestra las hWJMSC sin glucosa, mientras que los siguientes pares muestran ensayos con 40mM D-Glucosa por 0.5, 1, 2, 5, 24 y 48 horas respectivamente. ANOVA, $\alpha \leq 0.05$ 58

Índice de tablas

2.1. Tabla de umbrales de diagnósticos para la Diabetes Mellitus y las enfermedades prediabéticas [Williamson and Snyder, 2012].	7
3.1. Tabla de marcadores utilizados en la caracterización de las hWJMSC	32
3.2. Tratamientos de diferenciación neural	34
3.3. Anticuerpos empleados para la inmunofluorescencia indirecta en hWJMSC inducidas a diferenciación neural	35
3.4. Set de primers diseñados para la identificación de genes de troncalidad y diferenciación neural	37
3.5. Set de primers diseñados para la identificación de genes diferenciación adipogénica	39
3.6. Tratamientos para estimular diferenciación osteogénica	40
3.7. Set de primers diseñados para la identificación de genes de apoptosis y estrés oxidativo	42
4.1. <i>Proliferación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas in vitro a diferentes concentraciones de glucosa.</i> Tabla comparativa de los tiempos de duplicación celular de hWJMSC <i>in vitro</i> en diferentes medios: CHANG, DMEM 10 % SFB y DMEMF12 10 % SFB con los siguientes tratamientos: Control, 20 μ M D-Glu, 30 μ M D-Glu, 40 μ M D-Glu, 30 μ M L-Glu y 40 μ M L-Glu. Identificando que los medios CHANG y DMEMF12 generan un TD bajo respecto al de DMEM 10 % SFB.	49

Presentación

1.1. Presentación

La diabetes se caracteriza principalmente por una concentración alta de glucosa en la sangre, desencadenando enfermedades. La diabetes mellitus (DM), principalmente la tipo 2, es uno de los principales problemas de salud en México, teniendo una prevalencia promedio de 14.7%. Las personas mayormente afectadas están entre los 20 y 79 años, destacando un gran porcentaje de mujeres en edad reproductiva. La DM durante el embarazo genera un ambiente desfavorable para el desarrollo embrionario y fetal, aumentando el riesgo de morbilidad y mortalidad perinatal. La diabetes materna pregestacional (Diabetes Mellitus tipo 1 o tipo 2) genera un mayor riesgo de defectos de nacimiento de amplio espectro, entre los que se encuentran los defectos en el desarrollo del sistema nervioso central, como defectos del tubo neural (NTD, *Neural Tube Defects*), anencefalia y espina bífida, así también como defectos cardiovasculares. La hiperglicemia altera vías de señalización y expresión de genes proapoptóticos, sugiriendo como factor que interviene en los defectos congénitos. El tubo neural al derivarse de las células troncales neurales (*Neural Stem Cell, NSC*), se hipotetiza que en un embarazo diabético, los NTD resultan de la expresión alterada del control del desarrollo de genes, lo que conduce a la proliferación y desarrollo anormal de las células del NSC. En particular, la diabetes materna inhibe la expresión de Pax3, un factor de transcripción que se expresa en la cresta neural y las células neuroepiteliales. Como resultado, la cresta neural cardíaca y las células neuroepiteliales sufren apoptosis por un proceso que depende de la proteína p53. Esto proporciona una explicación celular para los defectos cardiovasculares y NTD inducido por la diabetes en el embarazo. El estudio de la hiperglicemia en el desarrollo fetal y sus efectos se han realizado en modelos animales, *in vivo* en ratones y ratas e *in vitro* en NSC y células de la cresta neural de roedores. Por otra parte, no hay informes en la literatura sobre un modelo basado en células humanas para el estudio de la maternidad y diabetes durante el embarazo. Proponemos las células troncales mesenquimales extraídas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano (hWJMSC) como modelo celular, porque pueden ser fácilmente aisladas de cordones umbilicales de niños

de madres normoglucémicas o diabéticas, sin riesgos para el donante o preocupaciones éticas. Además, hWJMSC representa un población más primitiva que sus homólogos adultos, también retienen características de las células troncales primitivas, como la expresión de células troncales embrionarias, marcadores y capacidad de diferenciación multipotente. Por estas razones, hWJMSC podría proporcionar un modelo atractivo y alternativo para estudiar los mecanismos detrás de la diabetes y el embarazo.

1.2. Hipótesis

A mayor concentración de glucosa en cultivos celulares de hUCWJMSC, menor proliferación y aumento en apoptosis.

1.3. Objetivo general

Analizar el efecto de altas concentraciones de glucosa en cultivos celulares de hUCWJMSC provenientes de hijos de madres normoglicémicas y diabéticas, mediante su aislamiento, caracterización, proliferación, apoptosis y expresión de genes, para determinar la existencia de efectos citotóxicos.

1.3.1. Objetivos particulares

- Establecer el cultivo *in vitro* de hUCWJMSC aisladas de hijos de madres diabéticas y normoglicémicas, así como caracterizarlas por medio de la expresión de marcadores de células troncales mesenquimales (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105) y la nula o baja expresión de marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45) y endoteliales (CD31), mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia indirecta.
- Analizar la proliferación y capacidad de duplicación de las hUCWJMSC aisladas de ambos grupos de trabajo (hijos de madres normoglicémicas y diabéticas), bajo condiciones crecientes de glucosa, mediante curvas de proliferación y tiempos de duplicación, respectivamente.
- Establecer la diferenciación de las hUCWJMSC aisladas de ambos grupos de trabajo a células neurales, visualizando la expresión de marcadores de troncalidad (Nestina y SOX2), marcadores de diferenciación neural (Tubulina β III y MAP2) mediante RT-PCR e inmunofluorescencia indirecta.
- Establecer la diferenciación de las hUCWJMSC aisladas de ambos grupos de trabajo a células adiposas, visualizando las gotas de grasa características del tejido adiposo con tinción *rojo oleoso O*.

- Establecer la diferenciación de las hUCWJMSC aisladas de ambos grupos de trabajo a osteocitos, visualizando la acumulación de calcio intracelular mediante tinción con *Alizarin Red S*.
- Analizar la expresión de genes en las hUCWJMSC aisladas de ambos grupos de trabajo, bajo condiciones de hiperglicemia y tiempos de exposición diferentes por medio del análisis de la expresión diferencial de genes relacionados con estrés oxidativo (AMPK, HIF1 α) y apoptosis (BNIP3, p53) mediante RT-PCR semicuantitativo.
- Analizar la apoptosis en las hUCWJMSC aisladas de ambos grupos de trabajo, bajo condiciones de hiperglicemia y control a diferentes tiempos de exposición con ayuda de Anexina V y IP mediante citómetro de flujo.

Motivación

Los modelos murinos *in vivo* y los modelos de células troncales neurales o cresta neural *in vitro* son ampliamente usados para la investigación de embriopatías diabéticas, principalmente malformaciones congénitas del sistema nervioso central (SNC) y cardiovasculares. Sin embargo, es poco el conocimiento acerca de los mecanismos en el humano, ya que es difícil la obtención de muestras embrionarias humanas, así como su uso, debido a las consideraciones éticas y legales de la investigación en humanos. Las hUCWJMSC al ser células troncales asociadas a tejidos de recién nacido considerados de desecho y con características como: adherencia al plástico, expresión de marcadores de troncalidad, baja expresión o ausencia de marcadores hematopoyéticos y endoteliales, alto potencial de diferenciación y alta proliferación *in vitro*, se consideran con potencial para usar como modelo de investigación. Proponiendo el uso de hUCWJMSC para la determinación del efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la proliferación, apoptosis, diferenciación neural y expresión diferencial de genes contribuyendo en la comprensión de posibles mecanismos que modifican el desarrollo embrionario desencadenando malformaciones en hijos de madres diabéticas.

Planteamiento del problema

La DM es quizás una de las enfermedades más conocidas a nivel mundial, y a pesar de que ha habido progresos muy notorios en su entendimiento y tratamiento, presenta un aumento constante en la población, especialmente en los países en vías de desarrollo. En la actualidad, las cifras que reporta la Federación Internacional de Diabetes asciende a 415 millones de personas que la padecen en el mundo, siendo 1 de cada 7 nacimientos en condiciones de DM [IDF, 2015], aumentando la aparición de malformaciones congénitas en el embrión, principalmente las anomalías en el desarrollo del sistema nervioso central (ADSNC). Para conocer los efectos de la diabetes en el desarrollo embrionario se han

1. PRESENTACIÓN

utilizado modelos *in vivo* como embriones murinos en etapas tempranas de gestación expuestos a altas concentraciones de glucosa o *in vitro* células troncales neurales o de cresta neural de rata y ratón con y sin ADSNC para analizar los efectos de la glucosa sobre procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis, epigenética y expresión de genes. Sin embargo, es necesario conocer los mecanismos asociados a la diabetes en el humano, a pesar de los problemas legales y éticos que esto conlleva. Por su capacidad de diferenciación y sus características, las hUCWJMSC pueden servir como modelo de investigación. En el presente trabajo se cuestiona si concentraciones de glucosa superiores a las fisiológicas influyen en procesos celulares específicos como la proliferación, diferenciación (principalmente neural), apoptosis y, expresión de genes asociados a estrés oxidativo y apoptosis, así también como si el efecto es dependiente de la concentración de glucosa.

Contribuciones

Entre las principales contribuciones es proponer un modelo de investigación humano de obtención poco invasiva, disminuyendo así problemas legales y éticos, además de fácil aislamiento, alta proliferación *in vitro*, baja respuesta inmune al trasplante y capacidad de diferenciación no limitado al linaje mesenquimal. El uso de estas células como modelo permitirá comprender posibles mecanismos que intervienen en anomalías en el desarrollo del sistema nervioso central de los hijos de madres diabéticas, ampliando el panorama en los tratamientos de monitoreo de embarazos de madres con DM. Al ampliar la comprensión de los mecanismos asociados a la embriopatía diabética, aumentan las probabilidades de mejorar los tratamientos, las técnicas de prevención y diagnóstico, evitando que se desencadenen complicaciones de la enfermedad como malformaciones congénitas, daño en órganos, trastornos sistémicos o incluso aumentar las probabilidades de éxito en personas con predisposición a desarrollar la enfermedad.

2.1. Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar un incremento en la concentración de glucosa plasmática como resultado de alteraciones en la secreción de insulina, de la acción de la insulina o de ambas. El resultado es la aparición de hiperglicemia, alteración de los lípidos y glicación de las proteínas que desencadenan otros problemas de salud. La insulina es la hormona producida por el páncreas necesaria para transportar la glucosa desde la sangre al interior de las células del cuerpo donde convierte el azúcar, además de los almidones y otros alimentos en la energía necesaria para la vida diaria [NIH-NIDDK, 2017].

Existen diferentes tipos de Diabetes Mellitus debido a una compleja interacción entre genética, factores ambientales y alternativas respecto al modo de vida. Los tres tipos principales son: DM tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) y gestacional (DMG).

La DM1 (anteriormente llamada diabetes juvenil o dependiente de insulina) se caracteriza por el bajo o nulo desempeño de las células β pancreáticas causado por un proceso autoinmune, las cuales se encargan de la segregación de la insulina, provocando un déficit de ésta. Las personas que la padecen requieren administración diaria de insulina para regular la cantidad de glucosa en la sangre. Las causas que la provocan son desconocidas y actualmente no es prevenible [ADA, 2017].

La DM2 (también llamada no dependiente de insulina) es un grupo heterogéneo de trastornos que se suelen caracterizar por grados variables de resistencia a la insulina, alteración de la secreción de insulina y un aumento de la producción de glucosa. Constituye el 90% de los casos de diabetes; suele tener un inicio insidioso o silente; se asocia, generalmente, a obesidad o sobrepeso y sedentarismo. Los principales síntomas comienzan por la aparición de hiperglicemia, alteración de los lípidos y glicación de las proteínas, desencadenando síntomas desde pérdida de peso, sed excesiva, ganas desmedidas de orinar, hambre constante, cambios en la visión y fatiga, hasta enfermedades del corazón, ceguera, enfermedades renales y amputación. Entre los factores de riesgo más importantes son la edad, el sexo, la obesidad (particularmente la obesidad

abdominal), la baja actividad física y un historial familiar de diabetes [WHO, 2016]. El riesgo de desarrollar DM es del 40 % cuando uno de los padres tiene DM2 y casi el 70 % cuando ambos padres están afectados. Debido a los complejos patrones de herencia e interacción con el medio ambiente, la identificación de los genes implicados en la DM2 es un desafío. Sin embargo, durante las últimas décadas, se han aplicado estudios de vinculación y estudios de asociación de genes candidatos, estudios de asociación de genoma completo (GWAS), estudios de exoma y secuenciación de genoma completo en la búsqueda de antecedentes genéticos. Se han encontrado genes candidatos para la DM2 mediante análisis de ligamiento: CAPN10 (calpaína 10) identificado por primera vez en un estudio de mexicoamericanos, TCF7L2 (factor de transcripción 7, como 2) que codifica un factor de transcripción que media en la vía de señalización Wnt, PPAR γ que codifica el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma, un miembro de la superfamilia del receptor hormonal nuclear que regula la transcripción de varios genes, y especialmente los específicos del tejido adiposo, KCNJ11 (canal de rectificación interna de potasio, subfamilia J, miembro 11) codifica la subunidad del canal de potasio sensible al ATP, que desempeña un papel importante en la secreción de insulina [Stančáková, 2016].

La DMG es una condición temporal que se caracteriza por la intolerancia a la glucosa en cualquier grado, inicia o es inicialmente diagnosticada durante el embarazo y a largo plazo el riesgo a desarrollar DM2 aumenta. Durante el embarazo, la placenta produce varias hormonas que se oponen al efecto de la insulina y producen un incremento en los niveles de glucosa. El efecto hormonal, aunado al incremento normal de peso durante el embarazo predisponen a la diabetes. Se considera DMG cuando los valores de glucosa en sangre están por encima de la normalidad pero todavía están por debajo de los considerados para la DM2. Las mujeres con hiperglicemia detectada durante el embarazo corren un riesgo mayor de resultados adversos en el embarazo o parto [ADA, 2017].

Tabla 2.1: Tabla de umbrales de diagnósticos para la Diabetes Mellitus y las enfermedades prediabéticas [Williamson and Snyder, 2012].

Categoría	Glucosa plasmática en ayunas	Glucosa plasmática a las 12h	HbA1c ^a
Normal	$\leq 100\text{mg/dL}$ (5.6mM)	$\leq 140\text{mg/dL}$ (7.8mM)	$\leq 5.7\%$
Alteración de la glucosa basal	100-125mg/dL (5.6-5.9mM)		
Alteración de la tolerancia a la glucosa		140-199mg/dL (7.8-11mM)	
Aumento del riesgo			5.7-6.4%
Diabetes Mellitus	$\geq 126\text{mg/dL}$ (7mM)	$\geq 200\text{mg/dL}$ (11.1mM)	6.5%

^aHemoglobina glucosilada A_{1c}

2.1.1. Epidemiología

Datos de la IDF reporta 415 millones de personas con diabetes en el mundo, donde más del 80% de las muertes por esta enfermedad se registraron en países con ingresos medios y bajos. En México hay un 14.7% de prevalencia promedio, siendo la edad entre 20 y 79 años la más afectada con un aumento en la prevalencia a 15.8% y la más alta a nivel mundial. Se estima que en la región de América del Norte y Caribe hay 44.3 millones de personas con diabetes, de los cuales 13.3 millones no están diagnosticados [IDF, 2015].

Nuestro país ocupa el 6to lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes, el 1er lugar en mortalidad en América Latina y el 3er lugar en el mundo [Arredondo et al.,2016].

Los principales factores de riesgo de la DM son edad mayor de 45 años, sobrepeso, antecedentes de DM en familiar de primer grado, inactividad física habitual, permanencia a un grupo étnico o racial de riesgo elevado, antecedente de parto de hijo de mayor o igual que 4.1kg de peso o de DM gestacional, hipertensión, dislipidemia, alteración de la tolerancia a la glucosa o alteración de la glucosa basal [Williamson and Snyder, 2012].

Por otra parte, en 2012, la diabetes generó costos a nivel mundial de aproximada-

2. MARCO TEÓRICO

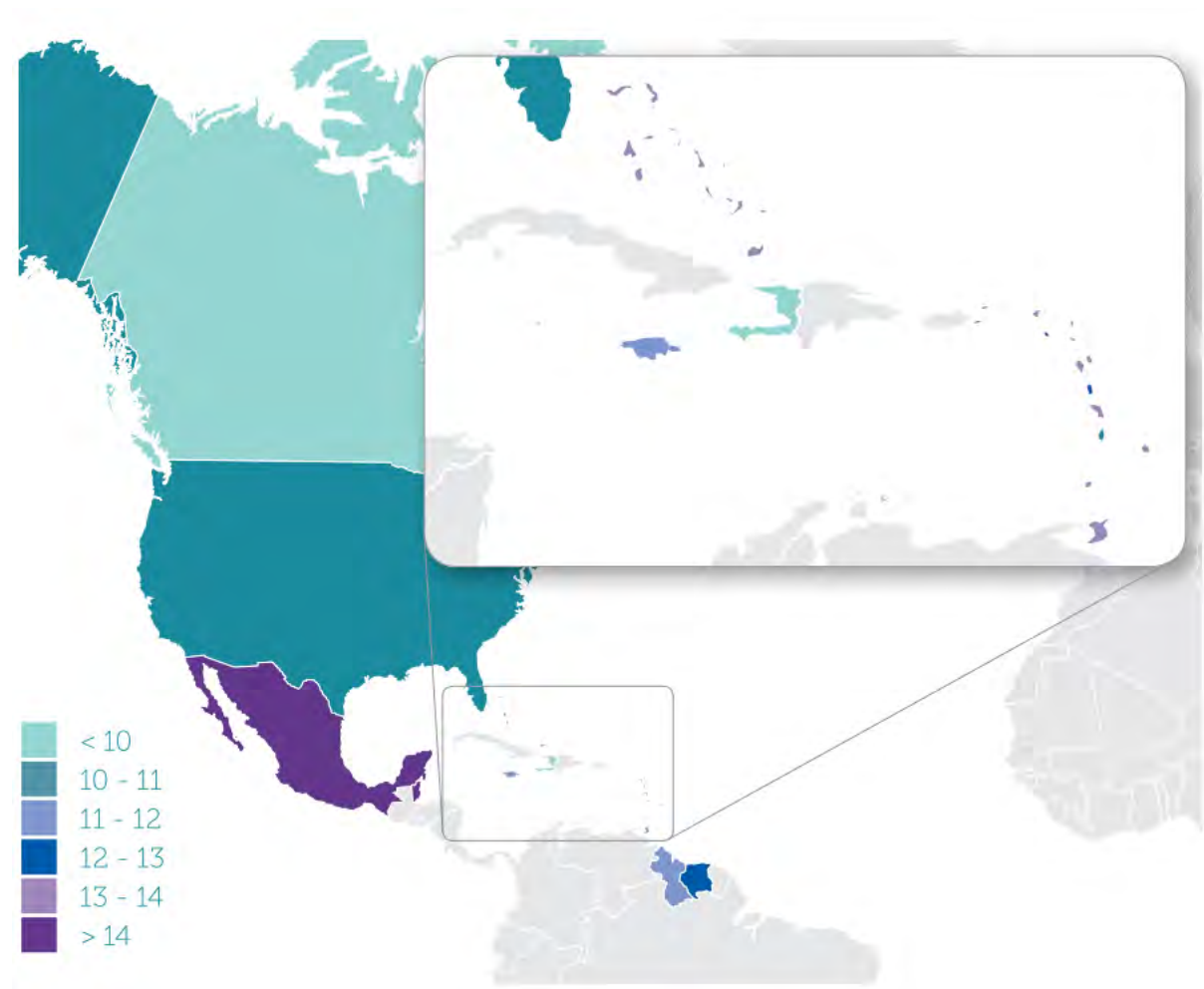


Figura 2.1: Mapa de % de prevalencias ajustadas a la edad de 20-79 años. Mapa de América del Norte y Caribe indicando mediante tonalidad de colores los porcentajes de prevalencia de Diabetes, observando que México es el más alto con 15.8% [IDF, 2015]

mente \$471,000 millones de dólares en gastos en salud. En 2013, la Fundación Mexicana para la Salud publicó el estudio Carga Económica de la Diabetes Mellitus en México, en el cual se desglosan los costos económicos de la atención de éste padecimiento en nuestro país. El estudio englobó los costos directos asociados al gasto en atención médica (incluyendo servicios médicos y medicamentos), y los costos indirectos, es decir, aquellos relacionados con el efecto que tienen la mortalidad prematura y la poca participación de una persona en el mercado laboral y su desempeño en el mismo. El análisis de Funsalud reveló que para 2013 la carga económica de la enfermedad, considerando los costos directos e indirectos se estimó en \$362,859.82 millones de pesos, lo que en ese periodo equivalió a 2.25 % del PIB [Arredondo et al., 2016].

2.1.2. Diabetes en el embarazo

La hiperglicemia en relación con los embarazos de mujeres con DM, se asocian con un aumento del crecimiento fetal y la morbilidad perinatal. En estudios con animales, la hiperglicemia intrauterina aumenta el riesgo de tolerancia anormal a la glucosa, diabetes, sobrepeso y resistencia a la insulina en la descendencia [Indians and Indians, 2008]. A pesar de los estudios en animales, todavía existen dudas sobre el impacto a largo plazo de la hiperglicemia intrauterina en los seres humanos.

Durante el embarazo se producen cambios metabólicos maternos para permitir la adaptación entre la modalidad de alimentación intermitente de la madres y continua fetal. A través de la placenta: *la glucosa*, principal fuente energética fetal es transportada por mecanismo de difusión facilitada, por lo que los niveles glicémicos del feto varían en función directa a los niveles glicémicos maternos. *Los aminoácidos* son transportados activamente para permitir la síntesis proteica adecuada, esencial para el crecimiento fetal. *Los lípidos* pasan a la placenta como ácidos grasos libres (AGL) y cuerpos cetónicos de acuerdo a niveles plasmáticos maternos. Durante los periodos post-pandriales, la elevación de la insulina y la glicemia materna, junto con la supresión relativa de glucagón y elevación de las lipoproteínas transportadoras de triglicéridos (VLDL), producen una acentuación de todos los fenómenos anabólicos a la unión feto-placentaria (“Anabolismo facilitado”), pero facilitando, a su vez, una condición diabetogénica para la madre. Además de existir un aumento progresivo de hormonas y citoquinas producidas por la placenta y, un aumento progresivo de los AGL, lo que lleva al aumento de insulinoresistencia progresiva en el curso del embarazo [Araya, 2009].

A) Acción diabetogénica leve:

- Estrógeno → ↑ Cortisol Libre (14)
- Progesterona → ↑ Glicemia (14,15)
- Prolactina → ↑ Insulinemia
- Cortisol → ↑ Insulinemia

B) Acción diabetogénica mayor → acción post-receptor

• Lactógeno placentario:

↑ Lipólisis materna

↑ Acción de resistencia periférica por alteración transportador: (glut 4).

• Factor de necrosis tumoral:

Aumento significativo 3^{er} trimestre promoviendo la fosforilación de la serina del sustrato del receptor de la insulina -1 (irs-1), disminuyendo la cascada de señales de la insulina: sería un factor predictor independiente de la resistencia a la insulina en el embarazo.

Figura 2.2: Acción diabetogénica producida en el embarazo. Hormonas y citoquinas producidas por placenta y su efecto en el cuerpo de la madre. [Araya, 2009]

Durante el embarazo, el páncreas está sometido a una mayor exigencia de adaptación, pueden producirse diversos grados de alteración del metabolismo de los carbohidratos; que estarían determinados genéticamente y podrían manifestarse por primera vez durante el embarazo (DMG) o agravarse en pacientes con diabetes pre-existente (DM1 y DM2).

La diabetes pregestacional expone al feto a concentraciones elevadas de glucosa, durante el primer trimestre del embarazo; los sistemas más frecuentemente afectados son el músculo-esquelético (hipoplasia de costillas y vértebras, síndrome de regresión caudal), cardíaco (defectos septales y del tracto de salida), sistema nervioso central y tubo neural (hidrocefalia, anencefalia, espina bífida, holoprosencefalia), gastrointestinal (atresias esofágica, anal y rectal, gastrosquisis) y genitourinario (agenesia o aplasia renal, riñón quístico, hidronefrosis, duplicación de uréteres) [Arteaga et al., 2008]. Además, los hijos de madres diabéticas podrían tener consecuencias a largo plazo como enfermedad coronaria, hipertensión arterial crónica, dislipidemia, obesidad y DM2 [Clausen et al., 2013].

El mal control de glicemia preconcepcional en el primer trimestre de embarazo au-

menta las malformaciones congénitas, en 10 veces; la mortalidad perinatal es 4-7 veces mayor y los recién nacidos tienen una mortalidad 3 veces mayor, en los primeros meses de vida que en los hijos de madres no diabéticas o diabéticas bien controladas [Araya, 2009].

Los efectos adversos de la hiperglicemia en el feto se han descrito desde hace mucho tiempo, múltiples estudios han demostrado que no solo la morbilidad sino también la mortalidad perinatal está definida por el control glucémico de la madre [Network, 2013].

Existen tres mecanismos principales que regulan la exposición fetal a los nutrientes maternos: la transferencia placentaria directa, el consumo de placenta y la conversión de la placenta en fuentes alternativas de energía. Aunque la transferencia directa se considera a menudo como la vía predominante en la regulación de intercambio fetal, la placenta tiene una actividad metabólica alta, que se ve afectada por un ambiente obesogénico y/o diabetogénico. Las alteraciones en el metabolismo de la placenta pueden servir como un punto de control para regular la exposición fetal y, en última instancia, determinar el grado de influencia que el metabolismo materno anormal tiene sobre el crecimiento y desarrollo fetal [Gallo et al., 2017].

En embarazos complicados por obesidad y/o diabetes, la glucosa parece ser el sustrato energético preferido para el metabolismo de la placenta, su captación aumenta en ambos estados. El transporte y el metabolismo de la glucosa, sin embargo, no son meramente modulados por la glucosa materna *per se*, sino que probablemente involucren una interacción compleja y dinámica con los factores de crecimiento fetal y otros sustratos energéticos. El procesamiento y la transferencia de lípidos por la placenta se ven influenciados de manera compleja por el IMC y el estado de glucosa. Mientras que un aumento en los lípidos maternos parece ser el sustrato predominante para conducir la macrosomía fetal en el sobrepeso materno, la obesidad y/o la diabetes, el aumento combinado de todos los combustibles probablemente contribuya al aumento del riesgo de resultados fetales adversos [Gallo et al., 2017].

2.1.2.1. Malformaciones congénitas y factores genéticos

Las malformaciones inducidas por el embarazo diabético surgen en las etapas más tempranas de la organogénesis, que corresponden aproximadamente a las primeras 8 semanas de gestación humana. Prácticamente cualquier sistema de órganos está sujeto a una malformación, pero el tubo neural y el corazón se afectan con mayor frecuencia [Mills et al., 1979]. Estudios en animales han revelado que los embriones bajo condiciones hiperglicémicas exhiben altos niveles de estrés oxidativo como resultado de la producción aumentada de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante alterada. El estrés oxidativo activa un conjunto de intermediarios de señalización de la cinasa pro-apoptótica que conduce a la muerte celular anormal en el tubo neural embrionario, que causa la formación de DTN [Yang et al., 2015].

Hay muchos genes en los que la diabetes materna puede inhibir la expresión y provocar defectos en otros órganos o contribuir a la DTN. Sin embargo, dado que Pax3 codifica un factor de transcripción que se expresa en neuroepitelio, cresta neural y

2. MARCO TEÓRICO

mesordermo, convierte al gen en esencial para el desarrollo, produciendo un DTN si su expresión sola se reduce por debajo de un umbral crítico [Li et al., 2005].

La etapa de desarrollo post implantación temprana es vulnerable para la inducción de DTN, ya que es justo antes del desarrollo del sistema circulatorio y coincide con una etapa de desarrollo en la que el embrión es relativamente hipóxico (2-8% de O_2 , en comparación con 20% en circulación arterial materna). El suministro de O_2 es limitado por difusión, y la masa creciente del embrión provoca un estado de hipoxia fisiológica que activa los genes que inducen la formación del sistema circulatorio. Por lo tanto, un ligero aumento en el metabolismo de la glucosa oxidativa como resultado del aumento de la administración de glucosa al embrión puede acelerar la utilización de O_2 antes de que el establecimiento del sistema circulatorio pueda aumentar la administración de O_2 .

Esto podría conducir a un estado de hipoxia que exceda la hipoxia fisiológica que es parte del desarrollo normal. La hipoxia puede estimular la producción mitocondrial de O_2 en los complejos II y III. Por lo tanto, es posible que el estrés oxidativo en el embrión sea el resultado, al menos en parte, de la producción de superóxido dependiente de la hipoxia, como consecuencia del agotamiento de O_2 por el aumento de la oxidación de la glucosa [Li et al., 2005].

Estudios en embriones de roedores han demostrado que las ROS aumentan por la diabetes materna o el cultivo con alto contenido de glucosa y que la administración de antioxidantes (Vitamina E, vitamina C, butilhidroxitolueno (BHT), el precursor de glutatión (GSH), N-acetilcisteína) o la sobreex-

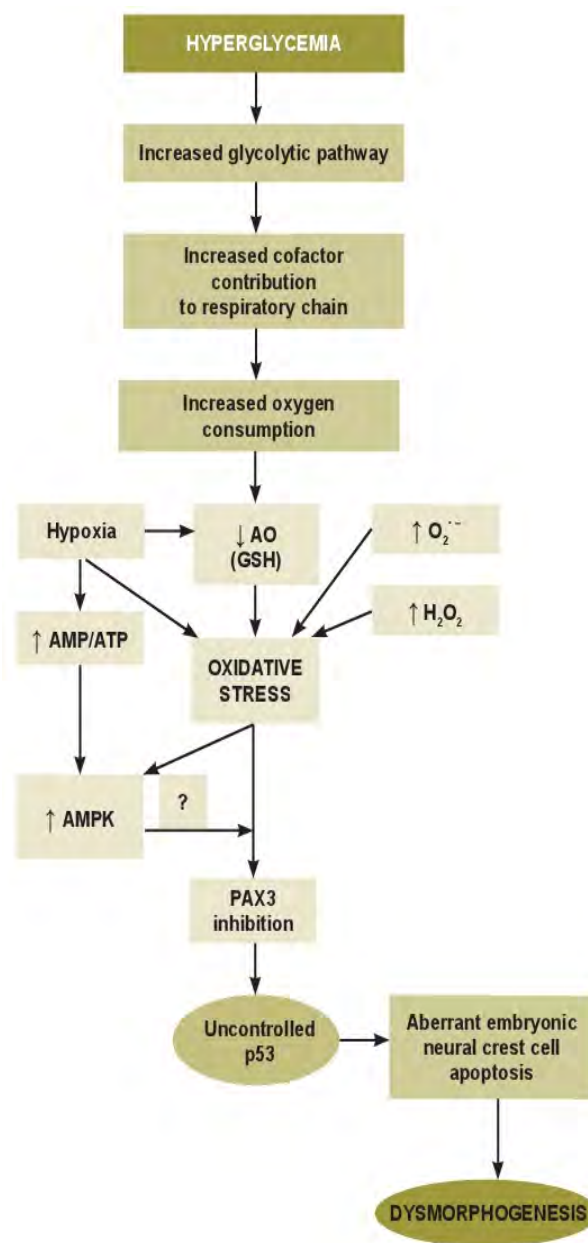


Figura 2.3: Mecanismo por el cual la hiperglicemia conduce a las dismorfogénesis. AMPK: AMP-dependiente de cinasa, GSH:GLutatión reducido, H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno, AO: Antioxidante, O_2 : Radical superóxido, p53: gen supresor tumoral. [Clapés et al., 2013].

presión transgénica de la superóxido dismutasa de Cu^{2+}/Zn^{2+} puede prevenir los defectos del desarrollo inducidos por la hiperglicemia, indicando que el estrés oxidativo inducido por hiperglicemia juega un papel causal en los defectos congénitos inducidos por la diabetes [Chang et al., 2003].

La proteína quinasa AMPK se activa en condiciones en las que la relación de AMP a ATP aumenta, que ocurre en la hipoxia. La generación mitocondrial de H_2O_2 también puede estimular la activación a través de la producción del radical hidroxilo (OH^-). Al activarse, AMPK puede trasladarse al núcleo y regular la expresión génica fosforilando las proteínas nucleares, como el factor inducible por hipoxia (HIF1 α). Sugiriendo que AMPK podría mediar los efectos del estrés oxidativo provocado por la hiperglicemia materna al alterar la expresión de genes específicos de control del desarrollo y por lo tanto, conducir a malformaciones [Wu et al., 2012].

El gen Pax3 controla la proteína p53, estimulando su degradación uniéndola a varias moléculas de ubiquitina. Cuando se reduce la expresión del gen Pax3, la proteína p53 no está regulada y la apoptosis aumenta [Clapés et al., 2013].

Aunque existe evidencia de un fuerte componente genético en la responsabilidad individual de los defectos del tubo neural en humanos, aún se sabe poco sobre la naturaleza de estos genes de riesgo, cómo interactúan entre sí, cuántos genes de riesgo están presentes en promedio en cualquier individuo afectado, si los mismos genes de riesgo son compartidos por todas las poblaciones, o cuán frecuente es cada gen de riesgo [Harris and Juriloff, 2010].

Las anomalías dismórficas inducidas por la diabetes se han atribuido al aumento de la apoptosis, la perturbación de la síntesis y el metabolismo de las prostaglandinas, la deficiencia de lípidos de la membrana, estrés oxidativo y el metabolismo alterado en general en el embrión. Se realizaron estudios con el fin de identificar los genes y las vías afectadas por la diabetes materna, realizando un perfil de expresión génica de embriones de ratón expuestos a la diabetes utilizando microarreglos de oligonucleótidos. Entre los genes identificados, asociados a DTN, están: HIF1 α , PDGFRA, TWSG1, ADAM10, TGF β r1, TFRC y VCL [Pavlinkova et al., 2009].

Ensayos muestran que la hiperglicemia podría aumentar la acumulación de p53, dando lugar a DTN. La hiperglicemia aumenta el estrés oxidativo en los embriones y provoca una mayor expresión de p53, lo que lleva a un aumento de la apoptosis neuroepitelial y defectos del tubo neural. Además de la apoptosis, la diferenciación anormal de los células troncales neurales (CTN) también se ha asociado con DTN, modificando la neurogénesis y gliogénesis [Jia et al., 2008].

HIF1 α es un factor de transcripción esencial que media la adaptación de las células a bajas tensiones de oxígeno, está regulado por hipoxia e hiperglicemia. El proceso de estabilización de HIF1 α por hipoxia es claro [Wang et al., 1995]; sin embargo, los mecanismos que subyacen al potencial efecto nocivo de la hiperglicemia en HIF1 α todavía son controvertidos. La glucosa y HIF1 α pueden influirse mutuamente: HIF1 α induce la expresión de enzimas glucolíticas y el metabolismo de la glucosa afecta la acumulación de HIF1 α en algunas células. El mecanismo podría ser explicado por el papel del metilglioxal en el deterioro de la estabilización de HIF1 α y la capacidad de transacti-

2. MARCO TEÓRICO

vación, el efecto negativo de ROS en HIF1 α , el papel de la osmolaridad y la actividad del proteosoma [Xiao et al., 2013].

Se ha observado un aumento de la apoptosis mediante la expresión aumentada de varios genes proapoptóticos, incluidos p53, BNIP3 y BID en el cerebro de embriones de ratones diabéticos. Estas proteínas proapoptóticas actúan inhibiendo proteínas antiapoptóticas tales como BCL2 y BCL-XL, que protegen a las neuronas inmaduras de la muerte. Por otro lado, la diabetes materna parece disminuir el índice mitótico en el tubo neural craneal. Se ha demostrado previamente que la exposición a niveles elevados de glucosa inhibe la progresión del ciclo celular en células madre neurales, células endoteliales de microvasos y células mesangiales, asociado con la disminución de genes implicados en la proliferación celular, como IGF2 y TGF β 2. Sugiriendo que la gluco-toxicidad causada por la diabetes materna altera la progresión del ciclo celular en el tubo neural craneal al regular la expresión de genes implicados en la apoptosis y la proliferación celular que posteriormente pueden dar lugar a malformaciones del tubo neural en embriones de ratones diabéticos [Jiang et al., 2008].

Functional category	# of genes	% of total	Gene Symbol
Transcription factors	15	12	Bcl11a, Cited4, Creb1, Crsp2, Hif1a, Klf9, Lin28, Nsd1, Rblccl1, Rnf14, Zfa, Zfp60, Zfp294, Zfp385, Zfp1002008Rik
DNA-binding/chromatin	8	6	Atrx, Baz1b, Exod1, Hist1h2bc, Hmgal1, Msl3l1, Setdb1, Top2b
Signal transduction	15	12	Aplg1, Arid4b, Gad1, Grb10, Mapk10, Phip, Pik3c2a, Plka, Ptp4a3, Ptpns, Rabgap1, Rp2h, Stam2, Ywhag, Zcsl3
Cell surface, incl. receptors	13	10	Agtr2, Aplp2, Cxadr, Efna2, Epha3, Ghr, Gpr65, Il6st, Itgav, Pdgfra, Ptpkr, Sema3a, Tgfbr1
Extracellular matrix/adhesion	9	7	Adam10, Ctse, Hs6st2, Ndst1, Ogt, Pcdh18, Pxn, Sell1, Twsgl
Cytoskeleton/microtubules	10	8	Dcx, Dnm1l, Epb4.1l2, Gmfb, Kif11, Mtap2, Snca, Tubb2b, Tubb2c, Vcl
RNA-binding	7	6	Arl5a, Dcp1a, Pabpc1, Rnpc2, Rod1, Sfrs2, Syncrip
Transporter/channels	9	7	Abcb7, Aqr, Cacna2d1, Mbtps1, Slc2a1, Slc16a3, Slc25a22, Stx17, Tm9sf3
Metabolism/enzymes	6	5	Aldh18a1, Blvrb, Gmpr, Pfkf, Tnks2, Upp1
Lipid metabolism	6	5	Etnk1, Hdlbp, Scd2, Sgpl1, Sptcl1, Stom
Metal-ion homeostasis	3	2	LOC669660, Mt2, Tfrc
Protein catabolism	9	7	Arih2, Nedd4, Supt16h, Usp7, Usp12, Eif3s10, Gopc, Lin7c, Vps35
Cell cycle/apoptosis	3	2	Api5, Birc4, Kras
Other	6	5	Dysf, Ivns1abp, Pelp1, Plekha5, Trim2, Trim44
Unknown	7	6	Heatr1, BC067396, I300007C21Rik, 6330503C03Rik, 6330527O06Rik, 6330578E17Rik, LOC640370
total	126	100	

Figura 2.4: Genes afectados en embriones por diabetes materna clasificados según su función. [Pavlinkova et al., 2009]

El estrés oxidativo activa un conjunto de intermediarios de señalización de la cinasa

pro-apoptótica que conduce a la muerte celular anormal en el tubo neural embrionario, que causa la formación de DTN. El trabajo en modelos animales también ha revelado que la diabetes materna desencadena una serie de intermediarios de señalización: isoformas de proteína quinasa C (PKC), PKC α , β II y γ ; apoptosis reguladora de la señal quinasa 1 (ASK1), c-Jun-N-terminal quinasa 1/2 (JNK1/2), caspasa y apoptosis [Yang et al., 2015]

La hiperglicemia activa múltiples vías metabólicas que producen ROS. La producción de radicales superóxido mitocondriales es la vía central en la que convergen cinco vías principales, activadas en condiciones de hiperglicemia: 1) glicosilación de la proteína no enzimática que produce productos finales de glicosilación avanzada (AGE); 2) aceleración de la ruta del poliol (controlada por la enzima aldosa reductasa) con la consiguiente disminución de NADPH, el cofactor de la enzima antioxidante glutatión reductasa y otros productos intermedios; 3) aumento de la actividad de la ruta de hexosaminas, en la que se forma N-acetilglucosamina; 4) expresión aumentada del receptor AGE y sus ligandos; y 5) activación de isoformas de proteína quinasa C. El estrés oxidativo afecta el desarrollo embrionario, aunque no por un efecto genotóxico directo, como se pensaba sino que afecta la expresión adecuada de algunos genes característicos de las diversas etapas del desarrollo embrionario. Cada gen afectado tiene sensibilidad específica a las condiciones hiperglicémicas y cambios en el estado redox celular. La manera en que el estrés oxidativo afecta el funcionamiento celular incluye, establecimiento de hipoxia en el embrión, aumento en la producción de radicales superóxido, disminución de la biodisponibilidad de antioxidantes y el consiguiente aumento de ROS y estrés oxidativo, produciendo una reducción en la expresión del gen PAX3 [Clapés et al., 2013]

2.1.3. Epigenética

La epigenética se define como "el estudio de cambios en la función genética heredable mitóticamente y/o meióticamente y que no implica un cambio en la secuencia de DNA". Estos cambios están influenciados por factores ambientales y pueden modular la expresión génica independiente de la secuencia de DNA mediante alteraciones químicas del DNA (metilación), de histonas (metilaciones, acetilaciones/desacetilaciones, fosforilaciones y ubiquitilaciones) y configuración de la cromatina (complejos enzimáticos remodeladores dependientes de ATP) [Jaenisch and Bird, 2003].

La metilación del DNA consiste en la introducción de grupos metilo, normalmente en citosinas que van seguidas de guaninas (sitios CpG). En los genomas adultos de vertebrados el 80 % de los sitios CpG están metilados, pero existe un tipo especial de secuencias ricas en CpG, denominadas "islas CpG" que permanecen siempre no-metiladas, ubicadas en regiones promotoras de los genes de expresión constitutiva y tejido específico. En la inmensa mayoría de los casos, la metilación de las islas CpG de los promotores supone la inactivación génica, ya sea bloqueando la unión de factores activadores de la transcripción o, a través de proteínas de unión a DNA metilado (Methyl CpG binding proteins: MECP2, MBD1-4, KAISO, etc) que actúan como represores transcripcionales

capaces de atraer co-represores, deacetilasas de histonas, etc. Las regulaciones epigenéticas pueden verse influenciadas por factores ambientales tales como la edad, la obesidad, la actividad física y la dieta [Wu et al., 2004].

Mediante estudios epidemiológicos, se pensaba que la exposición a un entorno intrauterino hiperglicémico aumenta el riesgo de desarrollar obesidad, DM2 y síndrome metabólico, entre otras enfermedades crónicas, más adelante en la vida. Sabiendo que las modificaciones epigenéticas median las interacciones genético-ambientales, que conducen a cambios persistentes en la regulación génica y las vías metabólicas.

En estudios recientes, se ha demostrado que el exceso de glucosa aumenta la acetilación de histonas en células de mamíferos, mientras que el exceso de donantes de metilo aumenta la metilación de ADN/histonas en la descendencia, proporcionando evidencia de la relación entre hiperglicemia materna (o dieta) y epigenoma fetal. Recientemente, se han identificado microARN sensibles a la glucosa tales como miR-26a, miR107 y miR-16 que muestran una expresión aumentada en condiciones de glucosa alta, lo que sugiere que los mecanismos epigenéticos podrían activarse por hiperglicemia. Además, se ha demostrado que los factores epigenéticos regulan la expresión génica de los genes de control del desarrollo y la especificación del destino de las CTN, aumentando el riesgo de DTN [Sukanya et al., 2012]. En otros estudios, se ha encontrado una metilación diferencial entre los casos de diabetes y los controles en varios loci asociados con la diabetes tipo 2, como PPAR γ , KCNQ1, TCF7L2, IRS1 y FTO [Stančáková, 2016].

2.2. Embriogénesis

El desarrollo prenatal se extiende un promedio de 280 días o 40 semanas, donde se identifican 2 etapas: la embrionaria, que inicia desde la fecundación hasta el final de la 8va semana de gestación y, la fetal, que abarca desde que termina la etapa embrionaria hasta el nacimiento.

La *fecundación* es el momento en el que la cabeza del espermatozoide se introduce en el óvulo, formándose el llamado cigoto o huevo fecundado. Los núcleos del óvulo y del espermatozoide se fusionan para que el contenido genético sea de 46 cromosomas. La fecundación sucede por lo general en el último tercio de la trompa de Falopio.

La *segmentación* consiste en una serie de divisiones celulares asincrónicas que experimenta el huevo fecundado. Luego de transcurridas aproximadamente 30 horas desde el momento de la fecundación, el cigoto realiza su primera mitosis, dando lugar a dos células, llamadas blastómeros, los cuales son células indiferenciadas y totipotentes (es decir, cada célula es capaz de generar a un individuo completamente normal). Los blastómeros pierden su totipotencialidad en el momento de la compactación. Después de completar 8 células, se constituye una mórula y se inicia el proceso de compactación. Cuando la mórula se encuentra en el útero aproximadamente 4 días después de la fecundación (pero antes de implantarse) ingresa al interior de ella, líquido proveniente de la secreción de las glándulas endometriales. A medida que éste líquido aumenta, aparecen espacios que confluyen para formar una cavidad central. A este proceso se le denomina

cavitación. Se forma así el blastocisto (células pluripotentes, capaces de generar todos los tejidos del embrión), el cuál está constituido por un embrioblasto que originará al embrión, y una pared que es el trofoblasto, el cuál originará parte de la placenta y anexos embrionarios, además de una cavidad central (Carlson, 2014).

La *implantación* consta de tres fases distintas, relacionadas y consecutivas, denominadas aposición, adhesión e invasión. Durante la aposición, el blastocisto encuentra su lugar de implantación, el lugar normal de contacto es la parte superior de la pared posterior del cuerpo del útero. En la fase de adhesión se produce el contacto directo entre el epitelio endometrial y el trofoblasto del blastocisto, con lo que el embrión queda inicialmente “pegado al útero”. Finalmente, durante la invasión el trofoblasto embrionario penetra y destruye el epitelio endometrial, y la membrana basal introduciéndose poco a poco en el estroma uterino e invadiendo los vasos uterinos. Paralelamente en el endometrio de algunas especies se desencadena la reacción decidual, generándose así una “capa compacta” de células que acumulan glucógeno y lípidos. Cuando el blastocisto invade el endometrio, el trofoblasto se diferencia en dos capas: una interna de límites celulares definidos llamada citotrofoblasto y otra externa sin límites celulares que se llama sincitiotrofoblasto, el cual, además de invadir el estroma endometrial, secreta la gonadotropina coriónica (CG), hormona que mantiene el cuerpo lúteo funcional durante el desarrollo embrionario. Mientras, en la región del nudo embrionario, comienzan a diferenciarse las células del hipoblasto que constituirán transitoriamente la hoja inferior del embrión. En la parte superior del nudo embrionario aparece un espacio que corresponde al inicio de la formación de la cavidad amniótica. De esta manera, se forma el embrión bilaminar, constituido por una hoja superior llamada epiblasto y una hoja inferior llamada hipoblasto. El epiblasto que constituye la hoja superior del embrión forma el piso del amnios. El hipoblasto que es la hoja inferior del embrión constituye el saco vitelino (Rojas et al., 2007).

La *gastrulación* consiste en una serie de movimientos celulares destinados a la formación de una hoja embrionaria denominada mesodermo. La gastrulación involucra sólo al disco embrionario, no al trofoblasto. Primero se forma la línea primitiva, que aparece como un engrosamiento en el extremo caudal del epiblasto, y define los lados derecho e izquierdo del embrión, debido a la convergencia de células hacia el plano medio. Luego estas células se invaginan formando el surco primitivo. Cuando esto sucede, las células del epiblasto pierden sus características de epitelio y adquieren forma mesenquimal (forma estrellada y capacidad de migrar individualmente). La migración de las células durante la gastrulación forma el mesodermo intraembrionario. Este proceso se ve facilitado por el ácido hialurónico, elaborado previamente por las células del epiblasto. El nudo primitivo está ubicado en el extremo craneal de la línea primitiva. Sus células se invaginan formando la fosita primitiva, y luego migran directamente en dirección cefálica, dando origen a la prolongación cefálica o notocordal, la cuál formará la notocorda y la placa precordal, esto es, “los organizadores del futuro sistema nervioso”. Cuando ha terminado la gastrulación, el embrión está formado por tres hojas embrionarias: una hoja superior llamada ectodermo, una hoja media el mesodermo, y una hoja inferior llamada endodermo. La gastrulación se caracteriza por una complejidad de eventos inductivos

2. MARCO TEÓRICO

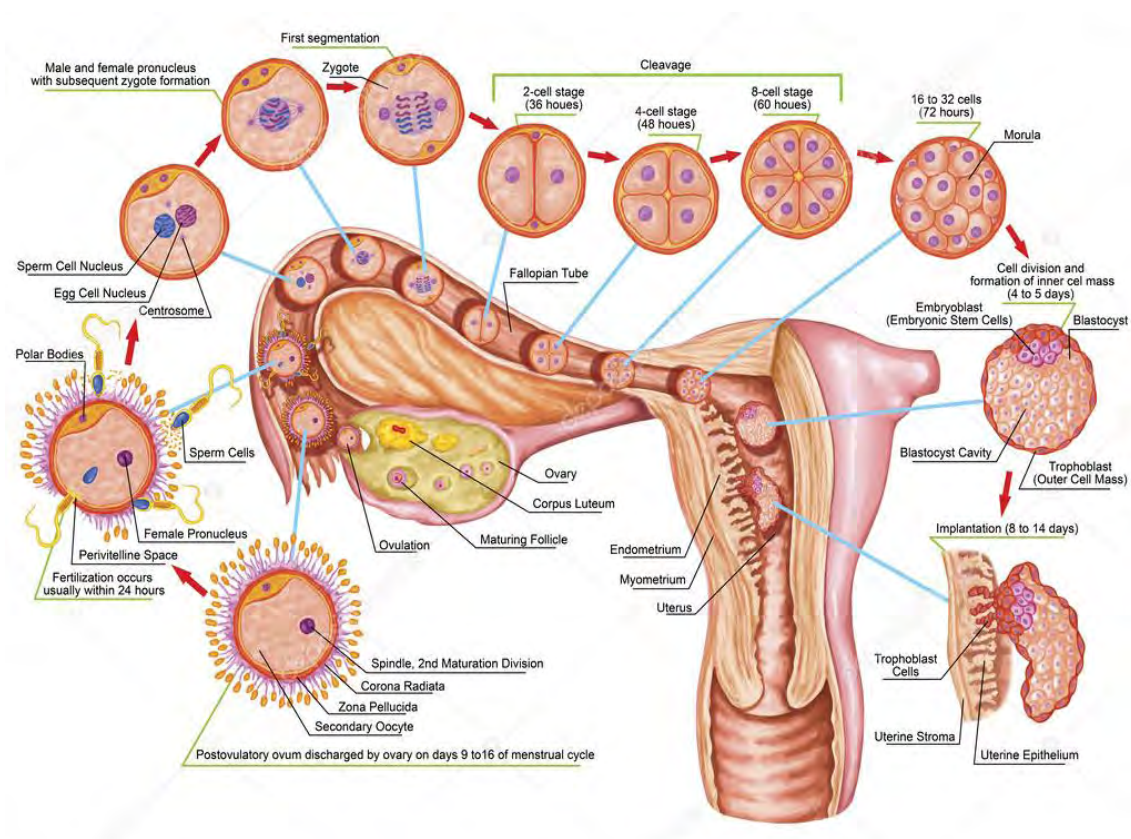


Figura 2.5: *Proceso de fecundación, segmentación e implantación del blastocisto.* [Ferres et al., 2017]

y movimientos celulares morfogenéticos que transforman a este embrión bilaminar en forma de disco en uno trilaminar y alargado, donde los principales ejes embrionarios (antero-posterior, dorso-ventral e izquierda-derecha) ya se han definido. Esta etapa del desarrollo es fundamental en la embriogénesis y cualquier defecto en su establecimiento es generalmente letal para el embrión (Carlson, 2014).

El *periodo somítico* es la etapa del desarrollo embrionario en la cual se forman los somitas a partir del mesodermo. Los somitas son cada uno de los segmentos que se producen en el mesodermo paraxial y que comienzan a producirse alrededor de la región cefálica-cervical hacia el comienzo de la tercera semana (a partir del día 20-21 aparece el primero). Este proceso comienza gracias a la expresión del gen *c-hairy* en las células del mesodermo paraxial. A partir de este punto se forman nuevos somitas en dirección cefalocaudal, más o menos tres pares por día, hasta que al final de la quinta semana se encuentran de 42 a 44 pares. Se distribuyen en: 4 occipitales, 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 8 a 10 coccígenos. El embrión somítico no tiene cara, cuello, ni extremidades. Además posee un corazón tubular, es decir, un tubo cardíaco

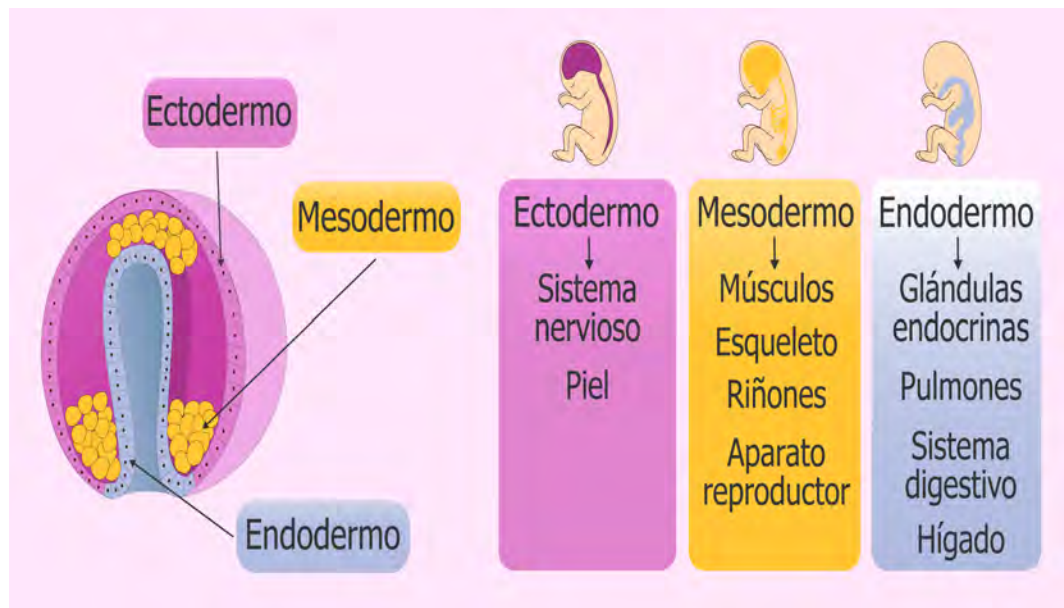


Figura 2.6: Representación del embrión trilaminar y el tejido al que da origen cada lamina germinal. [Ferres et al., 2017]

con una serie de cavidades dispuestas en sentido lineal. Durante este período, además de la formación de somitas y la metamerización del embrión, se completa la neurulación que se había iniciado en la gástrula tardía, se delimita el cuerpo del embrión y se establece la circulación embrionaria (Rojas et al., 2007).

En la *neurulación*, la hoja superior del embrión está formada por el ectodermo, que origina la epidermis y el neurectodermo, que es el tejido que origina el sistema nervioso. Este último se ubica sobre la notocorda y se extiende desde el nudo primitivo hacia el polo cefálico. Las células neuroectodérmicas aumentan de altura, por inducción de la notocorda y constituyen la placa neural. Algunos días después, los bordes laterales de la placa neural se levantan, dando el aspecto de una pseudoestratificación y quedando la zona central deprimida longitudinalmente. Los bordes solevantados reciben el nombre de pliegues neurales y la parte deprimida de surco neural. Posteriormente los pliegues neurales se siguen solevantando, acercándose en la línea media hasta unirse y fusionarse, constituyendo el tubo neural. El tubo neural comienza a cerrarse en la región cervical y desde aquí el cierre continúa hacia cefálico y caudal. Transitoriamente, el tubo neural comunica con la cavidad amniótica por sus extremos cefálico y caudal, mediante los neuroporos anterior y posterior. En la región cefálica, el tubo neural se dilata dando origen a las vesículas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El resto del tubo neural dará origen a la médula espinal. Durante el período en que se está cerrando el surco neural, desde sus bordes laterales se desprenden grupos de células que se disponen como bandas a ambos lados del tubo neural. Estos cordones celulares constituyen las crestas neurales. De las crestas neurales se originarán estructuras nerviosas como los

2. MARCO TEÓRICO

ganglios raquídeos, simpáticos y parasimpáticos, elementos celulares como melanocitos, células de Schawn y de la médula suprarrenal. Además, en la región cefálica, algunas células migran hacia la región facial donde constituyen la mayor parte del mesénquima de los procesos faciales y de los arcos branquiales y originarán los huesos, cartílagos y tejido conectivo de la cara y el cuello. El resto del ectoderma forma el recubrimiento externo del embrión y en la región cefálica diferencia las placodas auditivas y del cristalino, esbozos de los órganos de los sentidos correspondientes. Las placodas aparecen como engrosamientos del ectoderma en respuesta a un estímulo inductor del Sistema Nervioso en desarrollo (Rojas et al., 2007).

Durante el *período prefetal*, el embrión experimenta una serie de cambios morfológicos externos que lo llevan a adquirir las características propias de su especie. Específicamente, los cambios externos que transforman un embrión en un feto son la formación de la cara, del cuello y de las extremidades. Es necesario destacar que durante el período prefetal, al mismo tiempo que el embrión cambia su aspecto externo, van evolucionando los esbozos de los órganos internos, que corresponden a un embrión tubular, muy curvado, de aproximadamente 1 cm de longitud, en el cual se distinguen diferentes regiones: en la región cefálica, bastante abultada, se destaca, al centro, una depresión que corresponde al estomodeo o boca primitiva, la cual está circunscrita por una serie de elevaciones o procesos faciales generados por la proliferación del mesénquima que los constituye. En la superficie de estos abultamientos han aparecido algunos engrosamientos ectodérmicos, son las llamadas placodas, que corresponden a primordios sensoriales: placodas nasales, las placodas óticas y del cristalino. Más caudalmente, en la región ventral del tronco, se destaca una gran prominencia que corresponde al corazón en desarrollo, la prominencia cardíaca, y, más caudalmente a ésta, se observa la inserción del cordón umbilical, de base aún bastante ancha. Lateralmente, en esta región, aparecen los esbozos de las extremidades : dos anteriores, lateralmente a la eminencia cardíaca, y dos posteriores, caudalmente a la inserción del cordón umbilical (Moore et al., 2013) .

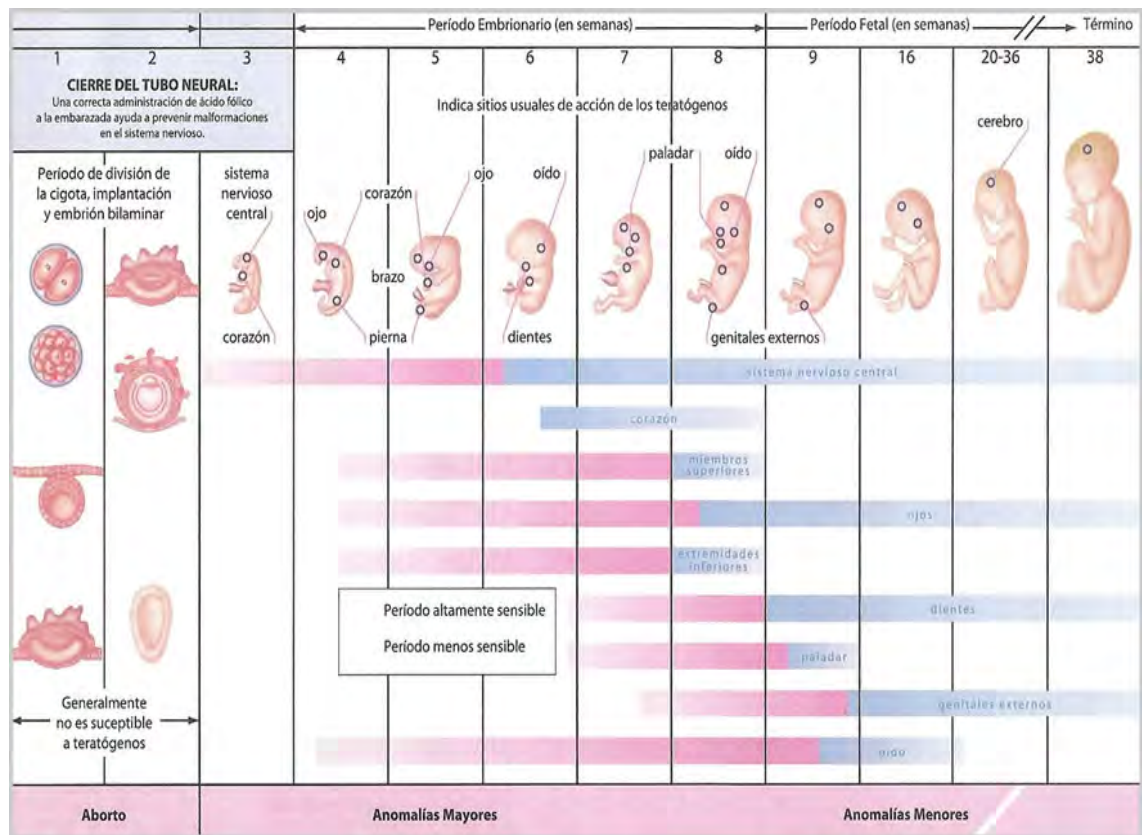


Figura 2.7: Desarrollo embrionario y fetal por semanas y organogénesis [Dumm, 2003]

El *periodo fetal* se inicia durante la 9ª semana post-fecundación y se caracteriza por el crecimiento del cuerpo y por la maduración fisiológica de órganos y sistemas. El crecimiento que es lento inicialmente (9-16 semanas de amenorrea) tiene por base la hiperplasia o multiplicación celular. A partir de las 16 semanas se inicia una fase de crecimiento rápido caracterizado fundamentalmente por hipertrofia (aumento de tamaño de las células) y también por aumento de la matriz extracelular. El crecimiento fetal está regulado por genes localizados en el cromosoma 11, pero existen algunos factores de riesgo como hipertensión, obesidad, desnutrición y tabaquismo de la madre que modifican las medidas antropométricas. La raza y origen étnico influyen también sobre el crecimiento [Rojas et al., 2007].

2.3. Células Troncales

Las células troncales se caracterizan por su capacidad única para auto-renovarse, diferenciarse en uno o más linajes celulares y tipos de tejido y, repoblar funcionalmente un tejido *in vivo* [Batsali et al., 2013]

El estudio de las células troncales comenzó a finales de los años 60's y se entendió durante la década de los 70's, con los trabajos realizados por *Friedenstein, et al.*, que fueron llevados a cabo en murinos, describieron por primera vez una población de células adherentes de médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético [Flores-Figueroa et al., 2004]. *Friedenstein et al.* fueron los primeros en desarrollar técnicas de cultivo para el aislamiento y diferenciación *in vitro* de las células troncales.

El término *célula troncal mesenquimal* (mesenchymal stem cell, MSC en inglés) fue utilizado por primera vez por *Caplan* en la década de los 90's, sin embargo, debido a que no existía un consenso acerca de las características que deberían tener estas células, durante la siguiente década surgieron muchos nombres, como progenitor estromal, célula progenitora mesenquimal, célula estromal de médula ósea, etc [Perdikogianni et al., 2008].

2.3.1. Origen

Hasta ahora se han aislado células troncales de varios tejidos, tales como músculo esquelético, tejido adiposo, cordón umbilical, sinovio, pulpa dental, líquido amniótico, así como sangre fetal, hígado, médula espinal, pulmón y corazón [Batsali et al., 2013].

La médula ósea (BM) es la fuente más popular de células troncales para la investigación y aplicación clínica, por lo tanto, la más estudiada, considerándola estándar de oro para células troncales en aplicaciones clínicas, pero su cosecha es invasiva y dolorosa con el riesgo de infección y morbilidad del donante, su frecuencia es baja y disminuye con la edad del paciente, así como sus propiedades cualitativas de éstas, poseen una capacidad de expansión deficiente y su uso se limita actualmente sólo al tratamiento autólogo [Fong et al., 2010]. Sin embargo, se está haciendo cada vez más evidente que la BM puede no representar la fuente más adecuada para la recolección de células troncales. Para eludir estos obstáculos, durante la última década se han invertido muchos esfuerzos en la identificación de fuentes alternativas, más abundantes y fácilmente alcanzables para uso terapéutico, como la sangre de cordón umbilical (UCB), el tejido adiposo y la placenta.

La UCB se obtiene por un método menos invasivo que la BM, pero el aislamiento de las MSC a partir de esta fuente es menos eficiente lográndose cultivos exitosos únicamente en el 30% de los aislamientos realizados; además, el volumen de UCB necesario para el aislamiento debe ser mayor a 30ml y el tiempo de procesamiento de la muestra no mayor a 15 horas. El tejido adiposo es otra fuente para la obtención de MSC que se puede obtener por medio de lipoaspirados y en volúmenes mayores con respecto a la BM y la UCB; sin embargo, se ha detectado la expresión del antígeno CD34 en células adherentes de cultivos tempranos derivados de tejido adiposo, lo cual pone de manifiesto un marcador de células hematopoyéticas y/o endoteliales y no de células mesenquimales lo que dificulta su caracterización inmunofenotípica, los estudios funcionales y su utilización en aplicaciones clínicas [Rodríguez-Pardo et al., 2010].

Las MSC, a diferencia de las células troncales hematopoyéticas (HSC, por sus siglas

en inglés, *Hematopoietic Stem Cells*), no expresan un antígeno único y específico para su identificación, generando controversia en su caracterización; por esta razón, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *Internacional Society Cellular Therapy*) ha propuesto criterios para la caracterización *in vitro* de MSC [Rodríguez-Pardo et al., 2010].

2.3.2. Clasificación

Con base a su capacidad para dar lugar a uno o más tipos de células, mejor conocida como potencia, las células troncales pueden clasificarse jerárquicamente como unipotente, multipotente, pluripotente y totipotente. Las células unipotentes pueden generar un sólo tipo celular, por ejemplo: las neuronas; mientras que las células multipotentes pueden diferenciarse en varios tipos celulares, por ejemplo: células troncales hematopoyéticas. Las células troncales embrionicas derivadas de la masa celular interna del embrión son pluripotentes porque pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales pero no en células trofoblasticas, mientras que el cigoto es totipotente, ya que produce células embrionarias y tejido extraembrionario [Batsali et al., 2013]

Basado en la presencia de marcadores específicos, las células troncales se pueden clasificar en células troncales embrionicas (ESC), células troncales hematopoyéticas (HSC) y células troncales mesenquimales (MSC) [Fong et al., 2010]. Las MSCs corresponden células de origen mesodérmico, se las considera multipotenciales con autorrenovación limitada y con capacidad de dar origen a tejidos de la misma capa embrionaria, aunque debido a las publicaciones actuales que muestran diferenciación a tejidos de otro origen embrionario podrían pasar a la categoría de pluripotenciales [Meruane et al., 2010].

2.3.3. Células troncales mesenquimales de cordón umbilical humano

El cordón umbilical es considerado un desecho médico que se obtiene mediante un procedimiento indoloro, simple y seguro durante el parto, por lo que ha despertado mucha atención como una fuente prometedora de aislamiento de MSC, tanto de sangre como del tejido. Sin embargo, la escasez de MSC en UCB y la falta de una técnica robusta y reproducible para cosechar y expandir MSC de UCB han dificultado su uso en aplicaciones clínicas [Perdikogianni et al., 2008]. Por otro lado los protocolos de aislamiento existentes han inducido constantemente la cosecha de un gran número de MSCs de tejidos de UC con un éxito del cien por cien. Las UC-MSc comparten muchas propiedades con las BM-MSc pero se consideran una población más primitiva. Además de que su investigación no plantea cuestiones éticas o legales [Batsali et al., 2013].

La formación del cordón umbilical ocurre entre la 5^a y la 12^a semana de embarazo. Es el resultado de la fusión del conducto onfalomesentérico y el alantoides. El alantoides originado de la extremidad caudal del intestino primitivo del embrión, pasa a situarse ventralmente con el doblamiento caudal del embrión, quedando posterior al pedículo del saco vitelino. El pedículo embrionario es desplazado en dirección al pedículo del saco vitelino, con el desplazamiento embrionario y la expansión amniótica, fusionando

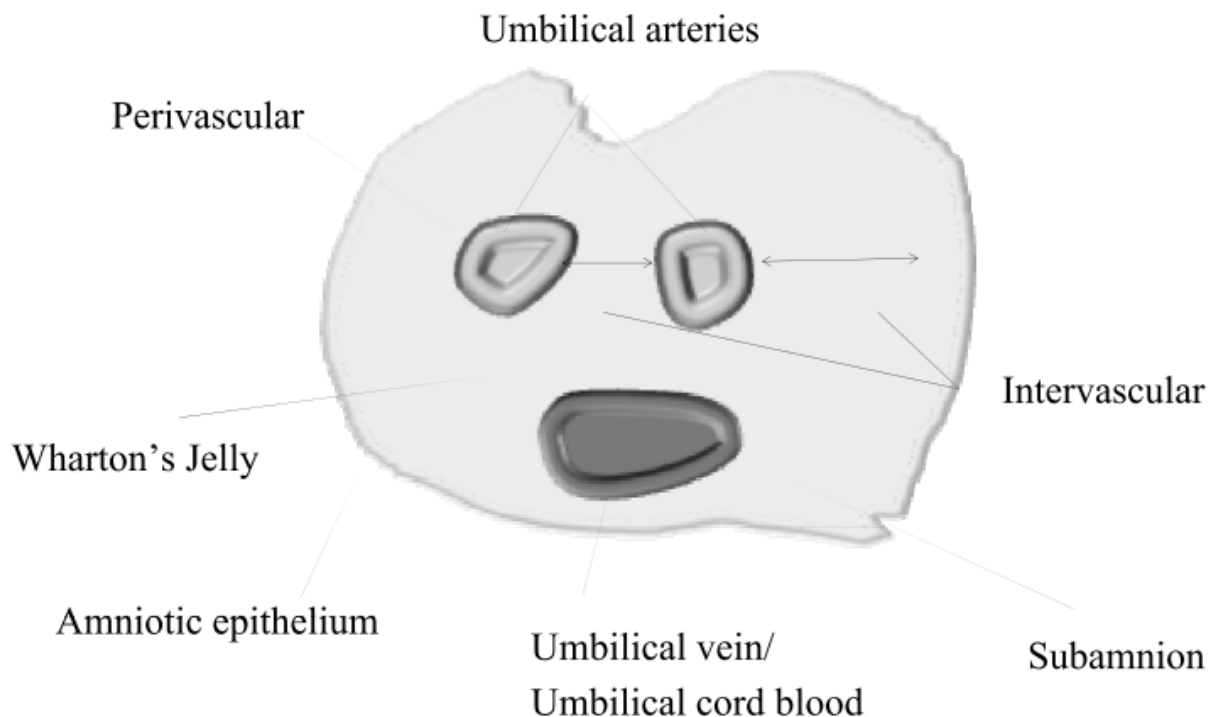


Figura 2.8: *Anatomía del cordón umbilical.* Corte transversal de cordón umbilical humano, observando la existencia de dos arterias y una vena [Batsali et al., 2013]

tales estructuras y formando así el cordón umbilical [Rojas et al., 2007]. El CU es una estructura en forma de espiral, tamaño variable (en promedio, a término, alcanza alrededor de 50cm de longitud), 2 cm de diámetro aproximado y alrededor de 100 gramos de peso. Une el embrión o feto a la placenta, teniendo como función principal aportar los nutrientes y el oxígeno necesarios para el buen desarrollo fetal. Está compuesto por dos arterias y venas, en disposición helicoidal o espiralada, dentro de un tejido conectivo mucoso o gelatinoso, la gelatina de Wharton, encerrada por un simple epitelio amniótico. Las MSC se han aislado de la sangre del cordón umbilical y también de las regiones intravascular, perivascular y subamniótica de la gelatina de Wharton [Batsali et al., 2013].

2.3.3.1. Gelatina de Wharton

La gelatina de Wharton (WJ, por sus siglas en inglés, *Wharton's jelly*) es una sustancia gelatinosa que envuelve el cordón y presenta una función protectora con relación a los vasos umbilicales. Así se evitan las compresiones o torsiones. Su textura está constituida por células musculares lisas y fibroblastos o miofibroblastos, que actúan en la

fibrogénesis y en la contracción celular [Kim et al., 2013]. Está hecha en gran medida de proteoglicanos y varios tipos de colágeno, formando un tejido similar a una esponja, dentro del cual están incrustadas las células del estroma. Se cree que estas células, también conocidas como células de la matriz del cordón umbilical, quedan atrapadas en la WJ al inicio de la embriogénesis durante su migración desde la región aorta-gonadotropina-mesonéfrica al hígado fetal a través del cordón umbilical. Las MSC derivadas de WJ (WJ-MSC), mantienen su capacidad de autorrenovación *in vitro* durante un período de tiempo más largo, y exhiben un tiempo de duplicación más corto y una pluripotencia más amplia en comparación con BM-MSC. Estas características junto con el hecho de que las UC-MSC pueden aislarse fácilmente, extracorpóreamente y sin riesgos para el donante, de un tejido que se descarta rutinariamente, resaltan las ventajas de las UC-MSC sobre las ESC y las MSC adultas y explican rápidamente creciente interés en este campo de la biología de células troncales [Batsali et al., 2013].

La capacidad multipotencial de las WJMSC comenzó a demostrarse *in vivo* desde su primera descripción, con los trabajos de *Friedenstein et al.* [Friedenstein et al., 1968]; éstos trabajos demostraron que WJMSC cultivadas *in vitro* y trasplantadas en ratones secundarios, eran capaces de producir fibroblastos y osteoblastos. Sin embargo, estos primeros estudios, realizados en modelos animales, únicamente demostraban la capacidad osteogénica de éstas células. Más adelante, los trabajos realizados por *Owen et al.* demostraron la capacidad de las WJMSC para producir condrocitos y tejidos conjuntivo [Ashton et al., 1980]. Los estudios de *Pittenger* demostraron la capacidad *in vitro* de las hWJMSC para diferenciarse en células adiposas, osteoblastos y condrocitos [Pittenger et al., 1999]. Estudios recientes sugieren que las WJMSC pueden diferenciarse no solamente en células del mesodermo, sino también pueden adoptar un destino endodermal o ectodermal, lo que se ha denominado como plasticidad celular. Varios grupos de investigación han estudiado intensamente la plasticidad de las WJMSC. Los primeros trabajos analizaron la capacidad de éstas células para diferenciarse en células musculares o miocitos [Haynesworth et al., 1992]. Gracias a los trabajos de *Prockop et al.*, quedó demostrada la capacidad de las WJMSC para diferenciarse *in vivo* en células de bazo, cartílago, médula, hueso [Pereira et al., 1995] y células pancreáticas endocrinas [Timper et al., 2006]. También se ha informado que las WJMSC se diferencian con éxito en células endoteliales [Chen et al., 2009]. Aunque la diferenciación en cardiomiocitos es controversial, se ha informado que cultivando WJMSC en medio apropiado se puede inducir células con morfología de cardiomiocitos y expresión de marcadores cardiacos (N-caderina y troponina cardiaca) [Conconi et al., 2006]. A pesar de que las WJMSC no diferenciadas expresan constitutivamente marcadores de linaje hepático, como albúmina, α -fetoproteína, citoqueratina19, connexin32 y dipeptidil peptidasa IV. Además de mostrar morfología similar a y regulación positiva de la expresión de marcadores a hepatocitos después de la inducción hepática, se reporta carencia importante de propiedades funcionales de las células hepáticas maduras [Campard et al., 2008]. Otros investigadores han afirmado que las WJMSC pueden inducirse a formar células similares a las islas pancreáticas, capaces de expresar genes asociados al páncreas y liberar insulina en respuesta a los niveles fisiológicos de glucosa [Wu et al., 2009]. *Mitchell et al.* fueron los

primeros que observaron la diferenciación neuronal en WJMSC, después de un proceso de inducción neuronal complejo, mediante ácido retinoico o factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb). La diferenciación se evaluó mediante cambios en la morfología y la expresión de enolasa específica de neutrófilo, TUB β III, neurofilamento y tirosina hidroxilasa. Estudios posteriores han corroborado estos hallazgos. También se ha sugerido que las UC-MSC pueden estar más preparadas para la diferenciación neuronal en comparación con las BM-MSC, ya que expresan niveles más altos de genes asociados a las neuronas, incluidos NESTIN, GFAP y SEM3A y, una serie de proteínas asociadas a microtúbulos específicos de neuronas, incluida la proteína asociada al cono de crecimiento (GAP-43), que se localiza en los axones [Mitchell et al., 2003]. Con respecto al potencial de transdiferenciación de las UC-MSC, tanto *in vitro* como *in vivo*, las células cultivadas en medio con bajo suero suplementado con FGFb se han inducido satisfactoriamente a diferenciación en células gliales (astrocitos [Reynolds and Weiss, 1992] y oligodendrocitos [Vescovi et al., 1993]) y neuronas colinérgicas [Liang et al., 2013], y neuronas con marcaje positivo a colin-acetil transferasa (ChAT) que secretan acetil colina [Zhang et al., 2012].

Los estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran la plasticidad de las MSC son apoyados por los resultados de los estudios de Tremain et al. y Seshi et al., que demuestran, mediante la técnica de microarreglos de expresión y de microSAGE, que estas células expresan transcritos no solamente de las líneas mesenquimales, como adipocitos, condrocitos, mioblastos, osteoblastos y de fibroblastos estromales, sino también, expresan transcritos característicos de linaje epitelial, neuronal y endotelial [Tremain et al., 2001], [Seshi et al., 2003].

2.3.3.2. Caracterización celular

Morfológicamente, las MSC se caracterizan por presentar una morfología biespigada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo alargado, central, que contiene de dos a tres nucléolos [Flores-Figueroa et al., 2004].

Las MSC, a diferencia de las HSC, no expresan un antígeno único y específico para su identificación, generando controversia en su caracterización; por esta razón, la ISCT ha propuesto tres criterios para la caracterización *in vitro* de MSC, estos son:

- 1) Demostrar el aislamiento de células con morfología fibroblastoide de tipo adherente al plástico en cultivo *in vitro*,
- 2) Determinar mediante citometría de flujo la expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90 en ≥ 95 % de MSC y, ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-I (≤ 2 % positivo) e
- 3) Inducir la diferenciación *in vitro* de las MSC en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos [Rodríguez-Pardo et al., 2010].

Las MSC son positivas para diversos receptores de factores de crecimiento y de matriz extracelular, como los receptores de IL1, IL3, IL4, IL6 e IL7, el receptor del factor

de crecimiento derivado de plaquetas (rPDGF), el receptor del factor de crecimiento neuronal (rNGF), los receptores del factor de crecimiento transformante beta I y II (rTGF β I y II), los receptores del factor de necrosis tumoral I y II (TNFI y TNFII), el receptor del interferón gamma (IFN γ) y transferrina, así como para las moléculas de adhesión, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, L-selectina, LFA-3, ALCAM, endoglina (CD105) y CD72. También expresan una variedad de integrinas incluyendo α 1, α 2, α 3, α 5, α 6, α v, β 1, β 3 y β 4. Por otra parte, éstas células son negativas a las siguientes reacciones citoquímicas: fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y sudán negro [Flores-Figueroa et al., 2004].

Tampoco expresan las moléculas coestimulantes CD80, CD86 ó CD40 o las moléculas de adhesión CD31 (molécula de adhesión de células plaquetarias/endoteliales [PECAM]-1), CD18 (antígeno-1 asociado a la función leucocítica [LFA-1]) o CD56 (molécula de adhesión celular neuronal-1), pero pueden expresar CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y Stro-1, así como la adhesión moléculas CD106 (molécula de adhesión de células vasculares [VCAM]-1), CD166 (molécula de adhesión de células de leucocitos activada [ALCAM]), molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 y CD29 [Chamberlain et al., 2007].

Diversas moléculas de gran relevancia en la hematopoyesis son producidas y secretadas por las MSC. Tales moléculas incluyen a componentes de la matriz extracelular (como las colágenas I, III, IV y VI, laminina, trombospondina, tenacina y fibronectina), así como citocinas (incluyendo IL6, IL11), el factor inhibitorio de leucemia (LIF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de células troncales (SCF), el ligando de FLT-3, la trombopoyetina (Tpo), el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1), el factor de crecimiento de placenta (PIGF) [Flores-Figueroa et al., 2004].

Muchos informes también han descrito que las MSC tienen propiedades inmunosupresoras, específicamente que las MSC pueden modular muchas funciones de las células T, incluida la activación celular [Nicola et al., 2017]. Esta supresión parece ser independiente de la coincidencia de MHC entre las MSC y las células T. Algunos informes han demostrado que el contacto directo célula-célula es necesario para la supresión [Krampera et al., 2003], mientras que otros han demostrado que la actividad supresora depende de un factor soluble [Blanc and Ringde, 2003]. También se ha demostrado que las MSC tienen propiedades inmunomoduladoras que afectan la maduración y la función de las células dendríticas y que las hMSC inhiben la proliferación, la diferenciación y la quimiotaxis de las células B humanas in vitro [Chamberlain et al., 2007].

La capacidad de las MSC para autorenovarse es fundamental para su función como un depósito de células primitivas. Por el contrario, la mayoría de las células somáticas tienen una capacidad limitada de autorrenovación debido al acortamiento de los telómeros. La telomerasa es una ribonucleoproteína que replica los telómeros durante la fase S de la mitosis [Wright et al., 1996]. La actividad de la telomerasa se encuentra en las líneas de células germinales, tumorales y embrionarias humanas, y se cree que es responsable de la capacidad ilimitada de autorrenovación de estos tipos de células

2. MARCO TEÓRICO

Markers		WJ-derived MSCs	Perivascular MSCs	BM-MSCs
CD10	neutral endopeptidase	+ [25]	+ [103]	+ [101]
CD11b	Integrin alpha-M	- [23]		- [102]
CD13	aminopeptidase N	+ [25]		+ [102]
CD14	LPS receptor	- [25]	- [49]	- [102]
CD26	dipeptidylpeptidase 4			+ [102]
CD29	integrin $\beta 1$	+ [25]	+ [49]	+ [5]
CD31	PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule-1)	- [25]	- [103]	- [5]
CD33	sialic acid binding Ig-like lectin 3	- [81]		- [101]
CD34	sialoprotein	- [24]	- [29]	- [5]
CD38	ADP-ribosyl cyclase 1	- [47]		- [101]
CD40	tumor-necrosis factor receptor superfamily 5	- [61]		+ [101]
CD44	hyaluronan receptor	+ [25]	+ [29]	+ [5]
CD45	pan-leucocyte antigen	- [25]	- [29]	- [5]
CD49a	integrin $\alpha 1$	- [104]		+ [5]
CD49b	integrin $\alpha 2$	+ [25]		+ [5]
CD49c	integrin $\alpha 4$	+ [25]		+ [5]
CD49d	integrin $\alpha 3$	+ [25]		- [5]
CD49e	integrin $\alpha 5$	+ [25]		+ [5]
CD50	ICAM-3 (Intercellular adhesion molecule 3)	- [105]		- [5]
CD51	integrin αV	+ [25]		+ [5]
CD53	Tetraspanin-25	- [104]		- [102]
CD54	ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)	- [47] + [105]	+ [29]	+ [5]
CD56	NCAM-1 (neural cell adhesion molecule)	- [61]		- [5]
CD58	LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3)	+ [81]		+ [101]
CD71	transferrin receptor	- [106]		+ [100]
CD73	Ecto-5 nucleotidase	+ [104]	+ [29]	+ [5]
CD80	CD28 ligand	- [81]		- [102]
CD86	Activation B7-2 antigen	- [81]		- [102]
CD90	Thy-1	+ [25]	+ [29]	+ [5]
CD105	TGF- β RIII (transforming growth factor- β receptor III)	+ [25]	+ [29]	+ [5]

Figura 2.9: Marcadores expresados por BM-MSC y UC-MSC derivados de WJ y la zona perivascular [Batsali et al., 2013]

[(Greider and Blackburn, 1989), (Meeker and Coffey, 1997)]. La actividad de la telomerasa es, por lo tanto, un marcador para las células troncales. Otro marcador de éstas células es el receptor del factor de células troncales, c-kit (CD117). c-kit es un receptor tirosina quinasa que se expresa en muchos tipos de células troncales específicas de tejidos y es esencial para muchos procesos de desarrollo, incluidos la hematopoyesis, la melanogénesis y la fertilidad [Ashman,1999].

2.3.4. Aplicaciones de la células troncales mesenquimales

El potencial de las terapias basadas en MSC para tratar una miríada de enfermedades humanas y animales enfatiza la importancia de comparar las diversas fuentes de células troncales y buscar una mejor comprensión de su capacidad proliferativa y potencial de diferenciación [Mitchell et al., 2003]. La capacidad multipotencial y la plasticidad de las MSC las hacen un blanco perfecto para su aplicación clínica a procesos biomédicos clínicos. Diversos grupos han demostrado que éstas células, después de haber sido cultivadas y expandidas *in vitro*, pueden ser trasplantadas. En la mayoría de los estudios en modelos animales se utilizó la radiación como un tipo de acondicionamiento para el trasplante. Sin embargo, *Allers et al.* encontró MSC después de ser trasplantadas en ratones no irradiados y sin ningún tipo de acondicionamiento previo al trasplante, en médula ósea, bazo y tejido mesenquimal, incluso después de un año postrasplante [Allers et al., 2004]. Otro modelo de estudio para evaluar el destino de las células trasplantadas es el trasplante *in útero* en ovejas. En éste tipo de modelo, se trasplantaron células troncales mesenquimales en ovejas fetales en etapas tempranas de gestación. Encontrando que las MSC humanas trasplantadas persistían en múltiples órganos después de 13 meses del trasplante. Las células trasplantadas se diferenciaron en condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos y células estromales de médula y timo [Liechty et al., 2001]. Las MSC también han sido utilizadas para mejorar el injerto de otras células. En estudios *in vivo* en el modelo de xenotrasplante en oveja fetal, se ha demostrado que el trasplante simultáneo de células hematopoyéticas con células troncales mesenquimales, tanto alogénicas como autólogas, resulta en un incremento del injerto a largo plazo de células sanguíneas circulantes del donador durante la gestación y después del nacimiento [Maitra et al., 2004]. Otra alternativa importante en la terapia celular es utilizar a MSC para promover la angiogénesis. Diversos estudios utilizando modelos de isquemia, han demostrado que éstas células tienen un efecto positivo en la recuperación del flujo sanguíneo [Heil et al., 2004].

Es importante recalcar que el empleo de MSC en esquemas terapéuticos en humanos ya se ha realizado con éxito. Se ha demostrado que las células troncales mesenquimales de humano pueden ser expandidas *in vitro* y trasplantadas en sujetos, sin causar efectos adversos; éstas células son bien toleradas por los pacientes y pueden ser detectadas a distintos tiempos postrasplante [Lazarus et al., 1995], siendo las STRO-1 positivas las MSC más apropiadas para utilizar en terapia génica y celular.

El potencial más prometedor del uso de las MSC es en aquellas enfermedades en las que hasta el momento no existe una terapia curativa, como es el caso de la osteogénesis

2. MARCO TEÓRICO

imperfecta, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad coronaria aguda, enfermedad injerto vs huésped de trasplantes, el infarto al miocardio o la enfermedad de Parkinson, entre otras. Los estudios de terapia celular para tratar a la osteogénesis imperfecta han avanzado desde modelos murinos, hasta su aplicación clínica [Mauney et al., 2005].

Sin duda, hoy en día las MSC son de gran interés para la biomedicina. Hasta el momento, el uso de éstas células en la clínica ha probado no tener riesgos para el individuo, no son capaces de producir teratomas e inhiben el rechazo inmunológico al ser trasplantadas [Flores-Figueroa et al., 2004]. Es por eso importante continuar con el estudio de estas células para conocer su biología, su capacidad de diferenciación y su papel en diversas enfermedades hematológicas, así como su aplicación en terapia celular y medicina regenerativa.

Metodología de experimentación

3.1. Aislamiento de células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano.

Las muestras de cordón umbilical humano fueron obtenidas de pacientes gestantes sanas y con DM2 diagnosticada antes del embarazo, que acudieron al Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Mediante un consentimiento informado autorizaron la recolección de aproximadamente 2 cm de cordón umbilical durante el alumbramiento, al departamento de Genética y Genómica Humana. El tejido fue recolectado en tubos cónicos de 50mL con solución salina de Hank's, para su conservación refrigerada y procesamiento en un plazo de 24 a 72 horas después de su recolección.

3.1.1. Cultivo primario

El protocolo que se siguió para el cultivo primario fue el descrito por Wharton [Dehkordi et al., 2016] con modificaciones propuestas. Primeramente, el tejido se lavó 3 veces con solución salina de Hank's con tratamiento de 100U/L de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 250 μ g/mL de fungizona para evitar contaminación del tejido. Se visualizaron los vasos sanguíneos (2 arterias y 1 vena) y se generaron explantes del tejido que los rodea. Dichos explantes se maceran mediante cortes finos, se agregan 500 μ L de medio CHANG para formar una sustancia gelatinosa, que se distribuirá en la superficie de frascos de cultivo Falcon de cuello inclinado y tapa sellada. Para favorecer el aislamiento de las células se agregan de 1 a 1.5 mL de medio CHANG por goteo y se incuban los frascos en condiciones fisiológicas estándar, es decir, 37°C de temperatura, 5 % de CO² atmosférico y 95 % de humedad relativa. Se monitoreó el cultivo cada 24 horas mediante su observación al microscopio binocular invertido Carl Zeiss Axiostar® visualizando los estadios de migración celular, confluencia y ausencia de microorganismos. Cada tercer día se cambia el medio para subastar de nutrientes suficientes al cultivo. Los explantes se retiraron a los 15 días y el primer pasaje celular se realiza aproximadamente a los 20

3. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

días, variando debido a la velocidad con la que se alcanza el 80-90 % de confluencia en el cultivo. Para despegar las colonias de células adheridas al plástico en monocapa, se utilizó tripsina al 0.5 % por 5 min más movimientos del pipeteo se desprendieron el mayor número de células que posteriormente se sembró en nuevos frascos para diferentes experimentos.

3.1.2. Inmunofenotipificación de hWJMSC por citometría de flujo

Basados en los criterios establecidos por la ISCT, se realizó la caracterización posterior a la expansión celular. Para favorecer las condiciones del experimento, las células empleadas son del 1^{er} o 2^o pasaje, además de haber sido previamente sembradas a una concentración de 1×10^5 células/mL en cajas Petri P60 con medio CHANG e incubadas por 3 días a condiciones estándar, para obtener una cantidad aproximada de $1-2 \times 10^6$ células. Dichas células se inmunofenotipan por citometría de flujo utilizando los siguientes marcadores celulares.

Tabla 3.1: Tabla de marcadores utilizados en la caracterización de las hWJMSC

Marcador de superficie	Fluoróforo	Dilución utilizada	Expresión en hWJMSC ^a
CD13 (APN)	APC/CY7 ^b	1 μ L/Test	+
CD31 (PECAM-1)	APC	5 μ L/Test	-
CD34 (Gp105-120)	PE/CY7 ^c	5 μ L/Test	-
CD44 (Hermes)	APC	1 μ L/Test	+
CD45 (LCA)	PE/CY7	1 μ L/Test	-
CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)	FITC ^d	5 μ L/Test	+
CD90 (Thy1)	PE/CY5 ^e	5 μ L/Test	+
CD105 (Endoglina)	PE	5 μ L/Test	+

^aExpresión de marcadores de membrana en hWJMSC de acuerdo a [Batsali et al., 2013](#)

^bAPC: Aloficocianina; CY7:Cianina 7

^cPE: Ficoeritrina

^dFITC: Isotiocianato de fluoresceína

^eCY5: Cianina 5

Las células preparadas para la caracterización se retiraron de la caja Petri con 1.5mL de PBS/EDTA 10mM por 3.5min y se recopilan mediante pipeteo en un tubo cónico de 5mL para centrifugarlas a 1200rpm por 8min; se lavaron con PBS, después de decantar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en PBS y se adicionó el volumen necesario de cada anticuerpo, se incubó por 15min a temperatura ambiente y protegidos de la

luz. Se fijaron las células con $300\mu\text{L}$ de buffer incubándolas por 10min, se lavaron con un 1mL de PBS y se centrifugan a 1500rpm por 5min para eliminar el exceso de fijador. Finalmente se resuspendieron en $100\mu\text{L}$ de PBS para ser leídas por el citómetro de flujo con el equipo BD FACSAriaTMIII (BD Bioscience Fisher) por el Dr. Ismael Mancilla del departamento de Infectómica del INPer. Se establecieron los límites de autofluorescencia para cada fluoróforo mediante lectura de hWJMSC sin teñir, mientras que para las hWJMSC teñidas con los anticuerpos CD31, CD34, CD45, CD44, CD13, CD73, CD90 y CD105 fueron evaluadas por marcajes sencillos y dobles, evitando que no interfieran las señales de fluoróforos, efectuando 100,000 eventos por muestra.

3.1.3. Selección de hWJMSC por FACS

Para clasificar las hWJMSC se emplearon aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células desprendidas de las cajas Petri P60 con 4mL de PBS/EDTA 10mM por 3.5min, se recolectaron y centrifugaron a 1200rpm durante 8min, para después decantar el sobrenadante y resuspender las células en PBS y el volumen de anticuerpo correspondiente para los siguientes tubos:

- Autofluorescencia
- CD31, CD34, CD45
- Tubo de recolección de células solamente con 1mL de medio CHANG

La clasificación se realiza mediante selección negativa, es decir, hWJMSC que no expresaran los marcadores CD31, CD34 y CD45. Entre 1×10^4 y 1.5×10^5 células fueron recolectadas en el medio CHANG, centrifugadas y sembradas en frascos de cultivo a condiciones estándar para proliferarlas y caracterizarlas de la siguiente manera:

- Autofluorescencia
- CD34, CD13, CD44
- CD31, CD73, CD90, CD105, CD45

3.2. Análisis de proliferación de hWJMSC

Para el estudio de proliferación se realizaron curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Las células que se utilizaron estaban entre el 2^o y 3^{er} pasaje después de la clasificación por FACS. Se despegaron empleando tripsina al 0.5%, se recolectaron y se centrifugaron 1200rpm por 8min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en DMEM 10% SFB. Se realizó un conteo celular mediante cámara de Neubauer empleando Azul de tripano en proporción 1:1 para evaluar viabilidad celular. Se sembró el volumen correspondiente a un aproximado de 2×10^4 células por mL en placas de 12 pozos con

3. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

1mL de medio: CHANG, DMEM y DMEM F12. Se monitoreó la proliferación cada 24 horas, despegando y contando las células de cada pozo por 4 días seguidos (24, 48, 72 y 96 horas). Con los datos obtenidos de proliferación a los diferentes tiempos se construyeron curvas de proliferación celular y se determinaron los tiempos de duplicación celular mediante la herramienta *doubling time computing*.

3.2.1. Análisis de proliferación de hWJMSC con glucosa

Para el análisis de proliferación de hWJMSC en condiciones de hiperglicemia se sembraron 2×10^4 células/mL en cajas de 12 pozos con 1 mL de medio: CHANG, DMEM y DMEM F12 con los siguientes tratamientos:

- Control sin glucosa añadida
- 20mM D-Glucosa
- 30mM D-Glucosa
- 40mM D-Glucosa
- 30mM L-Glucosa
- 40mM L-Glucosa

Igualmente, con los datos obtenidos por cada tratamiento en los diferentes medios se construyen curvas de proliferación y se obtienen los tiempos de duplicación mediante la herramienta *doubling time computing*.

3.3. Diferenciación neural

Después de evaluar diversos protocolos de diferenciación neural reportados en la literatura, se determinó el siguiente protocolo, al ser el más eficiente. Se utilizaron las hWJMSC seleccionadas como $CD34^-$, $CD31^-$ y $CD45^-$ por citometría de flujo. Las células se sembraron en placas de 12 pozos a una densidad de 2×10^4 células por pozo en medio CHANG a condiciones estándar con los siguientes tratamientos:

Tabla 3.2: Tratamientos de diferenciación neural

Ensayo	Pre-inducción β FGF 10ng/mL	Tratamiento (Forskolina 10 μ M)
Control negativo		
Control DMSO		
Control positivo	✓	✓
Control Forskolina		✓

3.3.1. Inmunofluorescencia indirecta

Se evaluó la diferenciación neural a nivel de expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta. Utilizando las células inducidas a diferenciación neural se realiza una fijación al cubreobjetos donde se sembraron con paraformaldehído por 15min. Después de permeabilizaron las células con Tritón X-100 por 20min y se bloquearon con solución de BSA a 2%, realizando lavados con PBS entre cada procedimiento. Se adicionó el anticuerpo primario de acuerdo a la siguiente tabla y se dejó incubar toda la noche.

Tabla 3.3: Anticuerpos empleados para la inmunofluorescencia indirecta en hWJMSC inducidas a diferenciación neural

Anticuerpo primario ^a	Isotipo	Dilución	Anticuerpo secundario ^b	Dilución
Anti-beta III Tubulin (TUJ1)	Mouse IgG _{2a}	1:2000	Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	1:200
Anti-Nestin	Rabbit Polyclonal	1:200	Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:200
Anti-SOX2	Rabbit Polyclonal	5 μ g/mL	Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:200
Anti-MAP2	IgG Rabbit Polyclonal Rabbit	1:1000	Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	1:150

^aDistribuidores de Anticuerpos primarios Covance Biologend: Anti-TUB, Anti-NES, Anti-SOX2, Anti-MAP2.

^bDistribuidor de Anticuerpos Secundarios Thermo Fisher.

Después se retiró el exceso de anticuerpo mediante lavados con PBS, para poder

3. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

adicionar el anticuerpo secundario correspondiente a cada anticuerpo primario. Igualmente se retiró el exceso de anticuerpo mediante lavados y finalmente se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con *Vectashield* proporción 1:1 con DAPI y sellados con esmalte transparente por la periferia del cubreobjetos. La observación de células fue mediante un microscopio de fluorescencia *Olympus Ix2-UCB* acoplado a una cámara digital *Orca-flash 2.8 Hamamatsu* con el software de análisis *Image and Vision Computing*.

3.3.2. Expresión de genes

Para la expresión de genes, primeramente se aisló RNA de los siguientes tratamientos:

- Control negativo
- Preinducción (3 días β FGF)
- Preinducción y diferenciación parcial (3 días β FGF y 4 días con Forskolina)
- Preinducción y diferenciación completa (3 días β FGF y 14 días con Forskolina)

Mediante la adición de 500 μ L de Trizol Reagent (Thermo Fisher) en cada pozo, se homogenizaron y recolectaron las células que posteriormente se separarían por fases con 100 μ L de Cloroformo (Sigma), se centrifugaron a 12,000rpm por 15min a 4°C. Se recolectó la fase acuosa y se agregaron 500 μ L de isopropanol, se centrifugaron a 12,000rpm por 10min, generando una pastilla gelatinosa que contenía el RNA. Se lavó el RNA con etanol al 75 %, se dejó secar y se resuspendió en agua. Una vez hidratado el RNA se cuantificó en *NanoDrop* para estimar la pureza y concentración de RNA en la muestra.

3.3.2.1. Síntesis de cDNA

El cDNA fue sintetizado con el kit *transcriptor first strand cDNA synthesis kit Roche*®, con el cual se llevan a cabo 2 reacciones. En la primera se utilizaron 2-6 μ g de RNA total, el cual es desnaturalizado a 65°C, más los *Random Hexamer Primers* diluidos en agua y se incubaron por 10min en el *Master cycler gradient Eppendorff*®. La segunda reacción consiste en la síntesis de cDNA con la enzima transcriptasa reversa, el buffer de reacción, el protector del inhibidor de la RNasa, la mezcla correspondiente de deoxinucleotidos y el producto de la reacción de desnaturalización, para después llevar a cabo la reacción a 37°C por 60min y finalizando a 85°C por 5min.

Los *primers* utilizados para la RT-PCR fueron diseñados con el software *Primer-Blast*, a partir de la búsqueda de la secuencia de mRNA del gen de interés en la base de datos de NCBI, identificando las secuencias correspondientes de unión a dos exones separados por un intrón en el DNA genómico. Además de permitir la amplificación de la mayoría de las variantes de procesamiento alternativo de los mRNA reportados

en la base de datos. Los *primers* mostrados en la siguiente tabla fueron sintetizados comercialmente por *Integrated DNA Technologies*:

Tabla 3.4: Set de primers diseñados para la identificación de genes de troncalidad y diferenciación neural

Gen	Base de datos	Secuencia ^a	Producto
β -actin	NM_001101.3	F: <i>TTGTAACCAACTGGGACGATATGG</i> R: <i>GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG</i>	763pb
GAPDH	NM_002046.5	F: <i>AAATCAAGTGGGGCGATGCT</i> R: <i>TGGTTCACACCCATGACGAA</i>	160pb
TUB- β III	NM_006086.3	F: <i>GGGGCCTTTGGACATCTCTTC</i> R: <i>ACCACATCCAGGACCGAATC</i>	125pb
MAP2	NM_002374.3	F: <i>CCGAGGAAGCATTGATTGGG</i> R: <i>CCTGCAACTATTCAAGGAAGTGG</i>	129pb
NESTIN	NM_006617.1	F: <i>CGCACCTCAAGATGTCCCTC</i> R: <i>CAGCTTGGGGTCCTGAAAGC</i>	128pb
SOX2	NM_003106.3	F: <i>CGGAAAACCAAGACGCTCAT</i> R: <i>TGTGCGCGTAACTGTCCAT</i>	148pb

^aLas secuencias fueron diseñadas para amplificar la mayor cantidad de variantes reportadas y con la inclusión de un intrón entrecada cebador para confirmar que no se amplifique la secuencia genómica, además de ser analizados con la herramienta *Oligoanalyzer* para la búsqueda de posibles interferencias homodiméricas y heterodiméricas.

3.3.2.2. Expresión relativa de genes de troncalidad y diferenciación neural por RT-PCR

Con el cDNA sintetizado se amplificó el gen de interés mediante el kit *HotStarTaq DNA Polymerase Qiagen*®. Se utilizan 2 μ L por muestra de cDNA con Taq DNA polimerasa, cloruro de magnesio (MgCl₂), *primers forward* y *reverse* y agua grado PCR. La reacción consiste en un conjunto de condiciones sucesivas, empezando con la incubación a 95°C por 15min, después a temperatura de desnaturalización 94°C por 30seg, seguido de la temperatura de alineamiento 59°C por 30seg, para pasar a la temperatura de extensión 72°C por 30seg, repitiendo este ciclo de 23 a 32 veces y, finalmente llegar

3. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

a 72°C por 10min para la extensión de amplicones. Al terminar los ciclos establecidos se almacenó a 4°C y se visualizó en un gel de agarosa.

3.3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos, se tiñeron las muestras con *Gel Red Biotium*® y se cargaron en un gel de agarosa al 2% junto con el marcador de peso molecular de 100 pares de bases *Thermo Fisher*®. Las muestras se estandarizaron utilizando el gen *housekeeping* Actina o GAPDH como referencia, para normalizar la cantidad de cDNA necesario al realizar la RT-PCR de los genes correspondiente. Los geles se observaron con el uso de un fotodocumetador con filtro UV, se tomaron fotografías de los mismos, exportándolas en formato TIF para posteriormente ser analizadas con el software *ImageJ*. Para analizar la señal de los genes de interés se normalizaron con respecto a la señal de la banda de Actina o GAPDH y se estimó el porcentaje de expresión respecto al control.

3.4. Diferenciación Adipogénica

La diferenciación adipogénica se llevó a cabo mediante el uso del medio de cultivo especializado *MesentCult™ Adipogenic Differentiation Medium (Human) Stem Cell Technologies*, el cual consta de un medio de cultivo basal para MSC y un par de suplementos con factores de diferenciación adipogénica, que se preparó conforme a lo establecido por el fabricante. Se utilizaron las hWJMSC seleccionadas negativamente por citometría de flujo, las cuales se sembraron en cajas de 6 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo en medio *MesentCult* a condiciones estándar con los siguientes tratamientos por 40 días, siendo monitoreadas cada 48 horas y realizando su respectivo cambio de medio:

- Control negativo: hWJMSC sembradas sólo en medio *MesentCult*
- Control positivo: hWJMSC sembradas en medio *MesentCult* suplementado

3.4.1. Tinción *Oil Red O Solution*

La diferenciación adipogénica se visualizó mediante la tinción de los depósitos vacuolares de lípidos, característicos en los adipocitos, mediante el uso de rojo oleoso O (*Oil Red O Solution Sigma-Aldrich™*) y el microscopio invertido. Para preparar la solución stock se pesó 0.5g de *Oil Red O Solution* y se disolvió en 100mL de isopropanol, se mantuvo toda la noche en movimiento en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente, posteriormente se filtró con 2 capas de papel filtro y se preparó la solución que se utilizaría para teñir las células. Se tomaron 0.6mL de la solución stock y se llevó a un volumen de 4mL con agua bidestilada, también se filtró a través de papel filtro un par de veces. De ésta solución se agregaron 2 mL a los pozos donde se encuentran las

células que se deseaban teñir, se dejaron incubar por 2 horas con movimiento a temperatura ambiente, se retiró el exceso de colorante lavando perfectamente al chorro de agua corriente, se agregaron 2mL de PBS y se observaron al microscopio invertido.

3.4.2. Expresión de genes de diferenciación adipogénica

Además de visualizar los depósitos de lípidos, se analizó la expresión del marcador de oro en diferenciación adipogénica, el gen PPAR γ mediante RT-PCR. El protocolo que se siguió para la expresión de genes es el mismo que se realizó durante la expresión neural. Primero, se extrajo el RNA de los tratamientos establecidos, posteriormente se sintetizó el cDNA con la ayuda de una RT-PCR. El par de primers utilizados para la amplificación del gen fueron los siguientes:

Tabla 3.5: Set de primers diseñados para la identificación de genes diferenciación adipogénica

Gen	Base de datos	Secuencia ^a	Producto
PPAR γ	NM_138712.3	F: <i>TGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTT</i> R: <i>GCCTGTGGCATTGCCCCAAA</i>	186pb

^aLas secuencias fueron diseñadas para amplificar la mayor cantidad de variantes reportadas y con la inclusión de un intrón entrecada cebador para confirmar que no se amplifique la secuencia genómica, además de ser analizados con la herramienta *Oligoanalyzer* para la búsqueda de posibles interferencias homodiméricas y heterodiméricas.

Posterior a la amplificación del gen PPAR γ se realizó una electroforesis con los productos de la RT-PCR en un gel de agarosa al 2% y se visualizó el gel mediante un fotodocumentador con filtro UV para poder exportar fotografías del gel y ser analizadas con el software *ImageJ*.

3.5. Diferenciación Osteogénica

La diferenciación osteogénica se llevo a cabo mediante estimulación con factores inductores de diferenciación osteogénica. Se sembraron 1×10^5 células por pozo en una caja de 6 pozos con 2 mL de medio DMEM F12 10% SFB y suplementado con antibiótico y fungicida para evitar contaminaciones. Se incubaron en condiciones estándar durante aproximadamente 48 horas, al alcanzar el 90% de confluencia se inició la estimulación conforme a la siguiente tabla:

3. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

Tabla 3.6: Tratamientos para estimular diferenciación osteogénica

Tratamiento	Pre-inducción FGF	Inducción		
		Dexametasona	Ácido ascórbico	β -Glicerofosfato
Control negativo				
Diferenciación 1		10 μ M	50 μ g/mL	10mM
Diferenciación 2	3 días	10 μ M		
Diferenciación 3		0.1 μ M		
Diferenciación 4		1 μ M		
Diferenciación 5	3 días	1 μ M		

Las hWJMSC se mantuvieron con los factores de diferenciación osteogénica por aproximadamente 14 días, con su respectivo monitoreo y cambio de medio cada 3^{er} día.

3.5.1. Tinción con *Alizarin Red S*

Después de aproximadamente 14 días en diferenciación osteogénica, las células se tiñeron con *Alizarin Red S* para detectar la mineralización. Los cultivos celulares se lavaron con PBS después de la eliminación de los medios, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se incubaron en 0.1% solución de *Alizarin Red S* durante 30 minutos con agitación suave. La solución de tinción en exceso se eliminó mediante enjuagues con PBS y agua destilada. La presencia de depósitos calcificados se visualizó con ayuda del microscopio invertido.

3.6. Análisis de apoptosis por citometría de flujo

Para el análisis de apoptosis de hWJMSC en condiciones de hiperglicemia se realizaron ensayos donde se sembraron 2×10^4 células por caja Petri P60 con 2mL de medio CHANG con los siguientes tratamientos:

- Control negativo
- Autofluorescencia (AF)
- Anexina-V
- Yoduro de propidio (IP)
- 2h 40mM D-Glucosa

- 2h 40mM L-Glucosa
- 24h 40mM D-Glucosa
- 24h 40mM L-Glucosa

Después de 24 horas de incubación a condiciones estándar, se agregó la glucosa a los cultivos señalados según las condiciones anteriores. Después de terminar el tratamiento, se recolectaron las células perfectamente identificadas en tubos eppendorf de 1.5mL y se agregaron los reactivos de Anexina o IP, incubándolos protegidos de la luz para de inmediato ser leídos mediante el citómetro de flujo.

3.7. Expresión de genes proapoptóticos y de estrés oxidativo mediante RT-PCR

La expresión de genes proapoptóticos y de estrés oxidativo se realizó de los siguientes tratamientos:

- Control negativo
- 1h con 40mM D-Glucosa
- 2h con 40mM D-Glucosa
- 5h con 40mM D-Glucosa
- 24h con 40mM D-Glucosa
- 48h con 40mM D-Glucosa

El protocolo que se siguió para la expresión de genes es el mismo que se realizó durante la expresión neural y adipogénica. Primero, se extrajo el RNA de los tratamientos establecidos, posteriormente se sintetizó el cDNA con la ayuda de una RT-PCR. Los primers utilizados para la amplificación de los genes fueron los siguiente:

3. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

Tabla 3.7: Set de primers diseñados para la identificación de genes de apoptosis y estrés oxidativo

Gen	Base de datos	Secuencia ^a	Producto
AMPK	NM_006251	F: <i>TGTCACAGGCATATGGTGGTC</i> R: <i>GGGCCTGCATACAATCTTCC</i>	191pb
BNIP3	NM_004052	F: <i>GCTCGCAGACACCACAAGAT</i> R: <i>AAAGAGGAACTCCTTGGGGG</i>	197pb
HIF1 α	NM_001530	F: <i>CCATGCCCCAGATTCAGGAT</i> R: <i>TCTGTGTCCTGAGTAGAAAATGGG</i>	199pb
p53	NM_000546	F: <i>CAACAACACCAGCTCCTCTCC</i> R: <i>TTTTTGGACTTCAGGTGGCTGG</i>	192pb

^aLas secuencias fueron diseñadas para amplificar la mayor cantidad de variantes reportadas y con la inclusión de un intrón entrecada cebador para confirmar que no se amplifique la secuencia genómica, además de ser analizados con la herramienta *Oligoanalyzer* para la búsqueda de posibles interferencias homodiméricas y heterodiméricas.

Posterior a la amplificación de los genes se realizó una electroforesis con los productos de la RT-PCR en un gel de agarosa al 2% y se visualizó el gel mediante un fotodocumentador con filtro UV para poder exportar fotografías del gel y ser analizadas con el software *ImageJ*.

3.8. Tratamiento de datos

Todos los datos obtenidos se almacenaron en una base de datos que posteriormente se utilizaron para realizar un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de medias con el software GraphPad Prism.

4.1. Aislamiento y cultivo celular

Al recolectar las muestras de cordón umbilical, se generaron los explantes de la gelatina de Wharton mediante cortes finos hasta generar un macerado que se colocó en las botellas de cultivo. Al incubar el tejido a condiciones estándar por ± 5 días comenzó la adhesión de éste al plástico, donde de forma gradual emergieron y migraron células fibroblásticas (fig. 4.1, inciso **a**). Posterior a la migración de las células, se formaron colonias que aumentan su tamaño respecto al tiempo mediante la interacción entre las células y la metabolización de los nutrientes del medio de cultivo CHANG, creando una monocapa de células fibroblastoides, doblemente espiculadas con distribución radial. Sin embargo, los cultivos primarios no son homogéneos, ya que se visualizan células romboides, aunque en menor proporción y conforme avanza la confluencia ésta baja hasta no ser observables.



(a) *Migración celular*

(b) *Cultivo Primario*

(c) *Cultivo confluyente*

Figura 4.1: *Morfología de células aisladas de WJ de cordón umbilical humano, cultivadas en medio CHANG suplementado con antibiótico y fungizona, incubadas a condiciones estándar. (a)* Migración espontánea de las células del tejido a la superficie plástica. *(b)* Cultivo primario en desarrollo después de retirar los explantes de tejido, observando la morfología fibroblástica biespiculada. *(c)* Cultivo confluyente en monocapa y tejido.

4.2. Caracterización, clasificación y enriquecimiento de las hWJMSC

Con el fin de enriquecer el cultivo celular de hWJMSC, se inmunofenotipificó por citometría de flujo las células del cultivo primario de la gelatina de Wharton mediante tinción sencilla con marcadores de troncalidad (CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105), hematopoyéticos (CD34 y CD45) y endotelial (CD31), que permitieron esbozar el fenotipo de las MSC. Primeramente, se definieron los parámetros de homogeneidad celular en tamaño y complejidad. Se observó que las células del cultivo primario expresaban un marcaje positivo para los marcadores CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, destacando que para CD13, CD44, CD90 expresan promedios mayores al 90 % y para CD73, CD105 el promedio de marcaje es mayor al 85 %. Además, una expresión disminuída de los marcadores CD31, CD45, es decir, más del 95 % de la población celular no expresaba dichos marcadores. Sin embargo, el marcador CD34 no expresaba un 56.76 % pero el resto sí, evidenciando la existencia de dos poblaciones una CD34⁺ y otra CD34⁻.

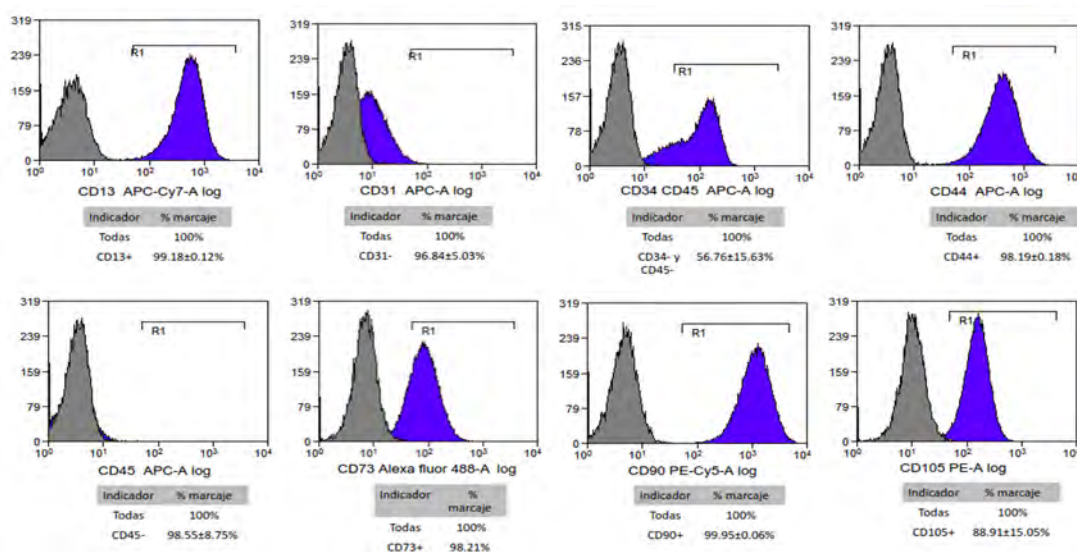
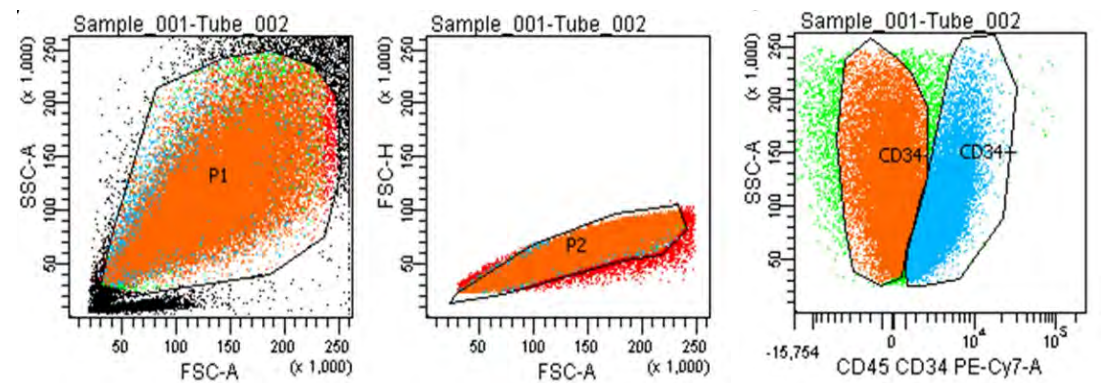


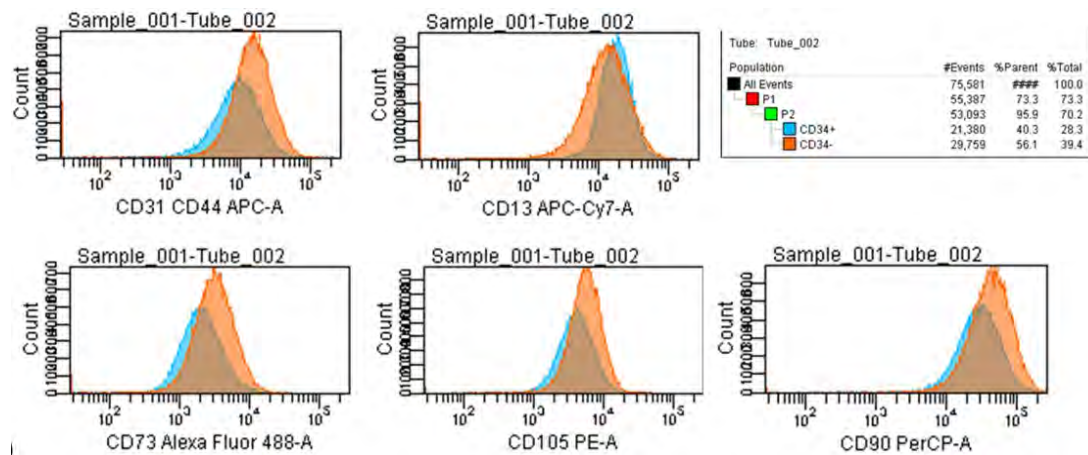
Figura 4.2: Caracterización celular con tinción sencilla de marcadores de superficie por citometría de flujo. Los gráficos muestran en color gris la autofluorescencia de las células correspondiente al fluoróforo usado; en azul se muestra la emisión de fluorescencia del anticuerpo correspondiente; los porcentajes indican el promedio de expresión y desviación estándar del marcador correspondiente; R1 muestra la región que indica el margen para determinar la positividad del marcaje sencillo, el cual se estableció previamente. $n=6$, número de eventos=100,000.

Posteriormente, se realizaron tinciones múltiples, que permitieron identificar la existencia de dos subpoblaciones una $CD34^+$, $CD45^+$ que representaba el 40% y otra $CD34^-$, $CD45^-$ con el 56% (figura 4.3). Al evaluarlas frente a los marcadores de troncalidad, se concluyó que la población que no expresaba los marcadores hematopoyéticos, era la que más expresaba los marcadores $CD44$, $CD73$, $CD90$ y $CD105$, excepto $CD13$ que fue ligeramente mayor su expresión en la población $CD34^+$, $CD45^+$.



(a) Selección de células por tamaño y complejidad.

(b) Identificación de subpoblaciones.

(c) Marcaje de marcadores positivos $CD13$, $CD73$, $CD90$ y $CD105$ **Figura 4.3:** Caracterización de las subpoblaciones en células de gelatina de Wharton.

A) Selección de la población celular mediante tamaño y complejidad. B) Identificación por marcaje doble con $CD34$ y $CD45$ de la presencia de dos subpoblaciones celulares coexistentes, en color azul $CD34^+$ (56%) y color naranja $CD34^-$ (40%). C) Caracterización de ambas poblaciones celulares con los marcadores positivos $CD13$, $CD73$, $CD90$ y $CD105$.

4. RESULTADOS

Con el fin de enriquecer el cultivo celular de hWJMSC que se utilizará para la demás experimentación, se realizó una selección negativa con los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y el marcador endotelial CD31, ya que los marcadores de troncalidad son similarmente expresados en ambas subpoblaciones. Mediante el equipo *FACS Aria III*, *BD Bioscience*® se seleccionaron con una eficiencia mayor al 98 %, sólo las células que no expresaban CD31, CD34 y CD45, que representan aproximadamente un 20 % de la población celular inicial. Después de ésta selección negativa se realizó una selección positiva a éstas células mediante la tinción con los marcadores CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105, con el fin de ratificar la expresión de éstos marcadores en las células seleccionadas y enriquecer la población celular. Basándonos en esto, se determinó que la población con fenotipo CD13⁺, CD31⁻ CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺ concuerda con los criterios establecidos y reportados para MSC por ISCT. Por lo tanto, a éstas células seleccionadas se les asignó el nombre de células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano.

4.3. Proliferación celular

Para determinar la proliferación de las hWJMSC se evaluaron 3 medios de cultivo diferentes: CHANG, DMEM 10 %SFB y DMEM F12 10 %SFB. Además de tratamientos con diferentes concentraciones de D-Glucosa y L-Glucosa, como se muestra en la tabla 4.1. Se observó una adaptación celular más rápida en los cultivos con medio CHANG y DMEMF12 respectivamente, en comparación con DMEM, en el cual además de la baja proliferación a pesar de ser el medio recomendado para su crecimiento se observó que células cultivadas mostraban un mayor número de muerte celular al cuantificarlas con Azul de Tripán en la cámara de Neubauer. Las curvas de proliferación (figura 4.4) muestran una tendencia exponencial, siendo estadísticamente significativa mayor en los medios CHANG y DMEMF12, en comparación con DMEM. Mientras que entre los medios CHANG y DMEMF12 no se identificó una diferencia significativa. Las curvas de proliferación a diferentes concentraciones de glucosa no se anexan, ya que no existió diferencia significativa entre éstas a excepción del medio CHANG en hWJMSC normoglicémicas, mostrando que las concentraciones 30mM y 40mM D-Glucosa tenían diferencia estadísticamente significativa respecto a su control. Al generar los tiempos de duplicación (TD) , se conoció el tiempo promedio que tardaba el cultivo celular en duplicar su número de células y se observó claramente que el medio CHANG y DMEMF12 respectivamente, fueron los medios en los que la proliferación era más rápida y sin células no viables al agregar Azul de Tripán.

Al igual que en las curvas de proliferación, los TD mostraron una diferencia significativa entre los medios CHANG y DMEMF12, en comparación con DMEM. Su TD promedio fue de 23.1 horas en los medios CHANG y DMEMF12, siendo menor comparado con el DMEM el cual presentó un letargo del 165 % respecto a los ya mencionados. Aunque el medio DMEM es ampliamente utilizado para el mantenimiento y proliferación de las hWJMSC (Wang et al., 2004; Mitchell et al., 2003; Conconi et al., 2006;

Walecka et al., 2017), se usó el medio CHANG para el mantenimiento de los cultivos, debido a su particular uso en cultivos primarios de células troncales de líquido amniótico y su extenso uso en el departamento de Genética del INPer, a pesar de la nula existencia de reportes en la literatura para las MSC.

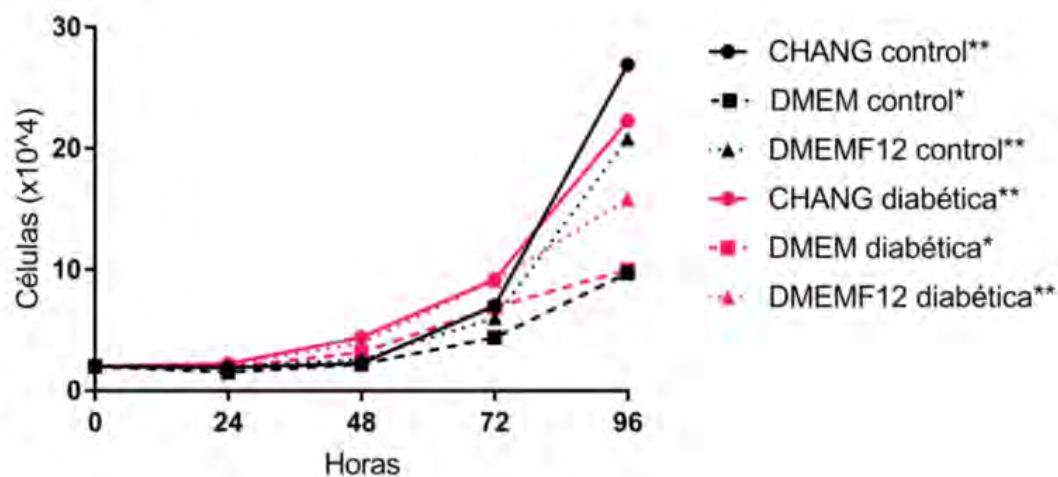


Figura 4.4: Curva de proliferación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas in vitro. En color negro se representan las hWJMSC normoglicémicas o control y, en color rosa las hWJMSC diabéticas. ● representa al medio CHANG, ■ al medio DMEM y ▲ al medio DMEMF12. * Diferencia estadística, DMEM vs CHANG/DMEMF12. ** Diferencia estadística, normoglicémicas vs diabéticas. ANOVA, $\alpha \leq 0.05$

4. RESULTADOS

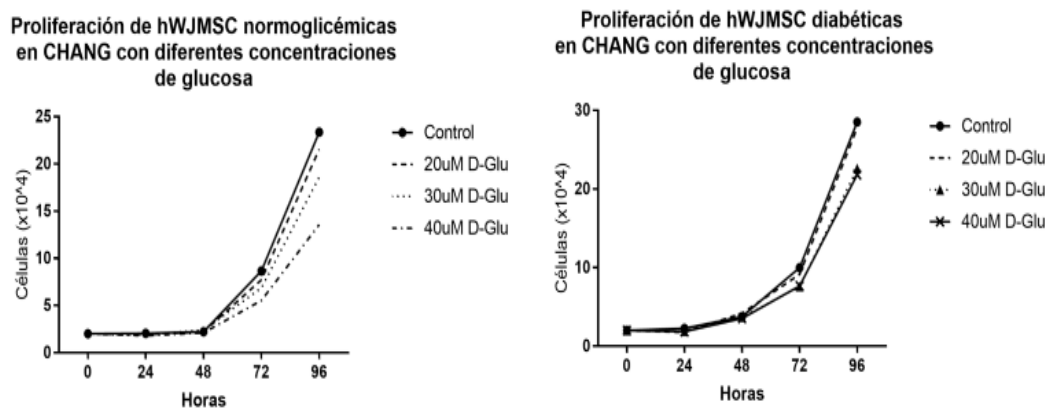


Figura 4.5: Curvas de proliferación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas con diferentes concentraciones de glucosa en medio CHANG. Observando que en las hWJMSC normoglicémicas el comportamiento es inversamente proporcional a la concentración mientras que en las hWJMSC diabéticas la proliferación se modifica pero la tendencia a disminuir la proliferación conforme se aumenta la concentración de glucosa permanece.

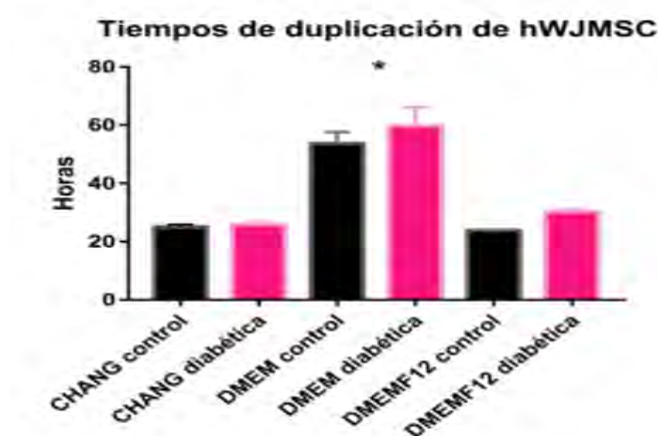


Figura 4.6: Tiempos de duplicación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas *in vitro*. Gráfica de tiempos de duplicación promedio de hWJMSC *in vitro* en diferentes medios de cultivo: CHANG, DMEM y DMEMF12. En color negro se representan las hWJMSC normoglicémicas o control y, en color rosa las hWJMSC diabéticas. * Diferencia estadística, DMEM vs CHANG/DMEMF12. ANOVA, $\alpha \leq 0.05$

Tabla 4.1: Proliferación de las hWJMSC normoglicémicas y diabéticas *in vitro* a diferentes concentraciones de glucosa. Tabla comparativa de los tiempos de duplicación celular de hWJMSC *in vitro* en diferentes medios: CHANG, DMEM 10% SFB y DMEMF12 10% SFB con los siguientes tratamientos: Control, 20 μ M D-Glu, 30 μ M D-Glu, 40 μ M D-Glu, 30 μ M L-Glu y 40 μ M L-Glu. Identificando que los medios CHANG y DMEMF12 generan un TD bajo respecto al de DMEM 10% SFB.

Medio de cultivo	Tratamiento	Control (horas)	Diabéticas (horas)
CHANG	Control	22.6 \pm 2.4	22.8 \pm 3.6
	20 μ M D-Glu	23.3 \pm 3	22.3 \pm 4.6
	30 μ M D-Glu	25.4 \pm 4 ^a	24.79 \pm 8.9
	40 μ M D-Glu	30.7 \pm 7.4 ^b	28.8 \pm 16.9
	30 μ M L-Glu	27.8 \pm 8	39 \pm 15.5
	40 μ M L-Glu	27.7 \pm 6.5	29.3 \pm 10.6
DMEM 10% SFB ^c	Control	38 \pm 14.1	54.3 \pm 12.7
	20 μ M D-Glu	48.3 \pm 15.3	83.3 \pm 30.9
	30 μ M D-Glu	55.5 \pm 19.2	48.7 \pm 23.7
	40 μ M D-Glu	65.7 \pm 29	59.25 \pm 20.8
	30 μ M L-Glu	59.5 \pm 24	73.9 \pm 26.1
	40 μ M L-Glu	55.5 \pm 22.8	48.4 \pm 14.2
DMEMF12 10% SFB	Control	23.6 \pm 3.1	28.4 \pm 3.3
	20 μ M D-Glu	24 \pm 5.3	28.1 \pm 1.2
	30 μ M D-Glu	24.3 \pm 2.4	31.7 \pm 4.9
	40 μ M D-Glu	26.8 \pm 3.7	32.5 \pm 3.4
	30 μ M L-Glu	23.6 \pm 2.5	29.6 \pm 5.1
	40 μ M L-Glu	23.4 \pm 3.6	31.9 \pm 4.4

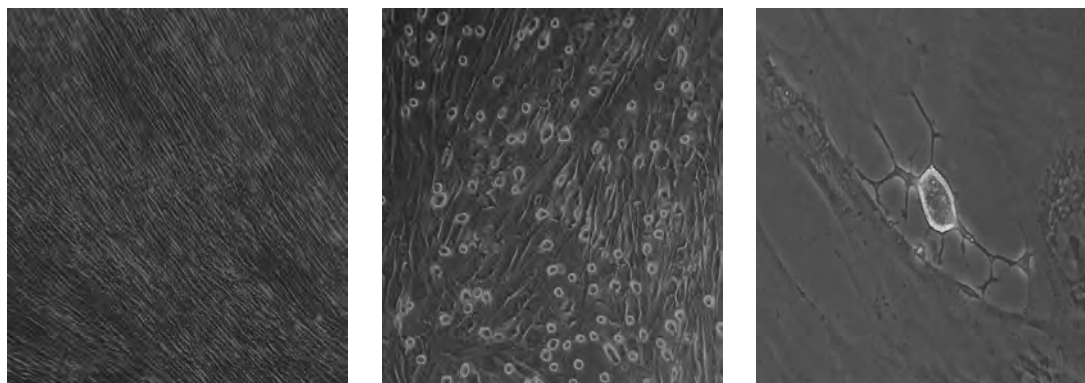
^aDiferencia estadística respecto al control, ANOVA $\alpha \leq 0.05$

^bDiferencia estadística respecto al control, ANOVA $\alpha \leq 0.05$

^cDiferencia estadística con medio CHANG y DMEMF12 10% SFB, ANOVA $\alpha \leq 0.05$

4.4. Diferenciación neural de hWJMSC

Con el fin de confirmar el tercer y último criterio establecido por la ISCT, se estableció inducir a diferenciación a diversos tejidos. Los cultivos de hWJMSC sembrados para diferenciación neural fueron tratados con un pre-tratamiento de 3 días con β FGF y un tratamiento de 14 días con Forskolina, mostrando cambios en estructura, tamaño y composición celular, transicionando de una forma fibroblástica biespiculada a células con cuerpo redondo y refractante bajo microscopía óptica además de prolongaciones provenientes del cuerpo celular propias de las células neurales. Cabe resaltar que aunque el tratamiento de inducción neural original sólo se pensaba realizar con Forskolina, se decidió adicionar un pre-tratamiento de 3 días con β FGF, ya que aumentó el número de células diferenciadas con morfología tipo neural, además de no detectar efectos citotóxicos.



(a) *Control negativo*

(b) *Cultivo diferenciado*

(c) *Célula tipo neural*

Figura 4.7: *Diferenciación neural de hWJMSC.* (a) Cultivo de hWJMSC control negativo a 100x. (b) Cultivo de hWJMSC con 3 días de pre-tratamiento con β FGF y 14 días con Forskolina a 100x. (c) Célula diferenciada que muestra claramente la morfología tipo neural con prolongaciones citoplasmáticas delgadas ramificadas a 400x.

Una vez realizada la diferenciación y visualizadas las células por microscopía óptica, también se evaluó la diferenciación a nivel de expresión de marcadores indicativos de troncalidad como SOX2, Nestina y marcadores de precursores de células neurales como MAP2, TUB β III, mediante la expresión de dichos genes a diferentes días de diferenciación neural por RT-PCR. Como resultado se observó que los marcadores de troncalidad y de diferenciación neural estaban presentes en las células aún sin inducción, situación que se mantuvo durante la pre-inducción con β FGF por 3 días pero al séptimo día de inducción con Forskolina el marcador Nestina y SOX2 comenzó a disminuir, la expresión de TUB β III se mantuvo y la de MAP2 aumentó. Al finalizar los 14 días de inducción neural, el marcaje de Nestina disminuyó notoriamente, mientras que la expresión de

MAP2 aumentó. Al realizar la cuantificación relativa de cada gen con respecto a β -Actina se observó una tendencia donde los marcadores de troncalidad disminuían y el marcador MAP2 aumentaba conforme el tiempo de inducción aumentaba.

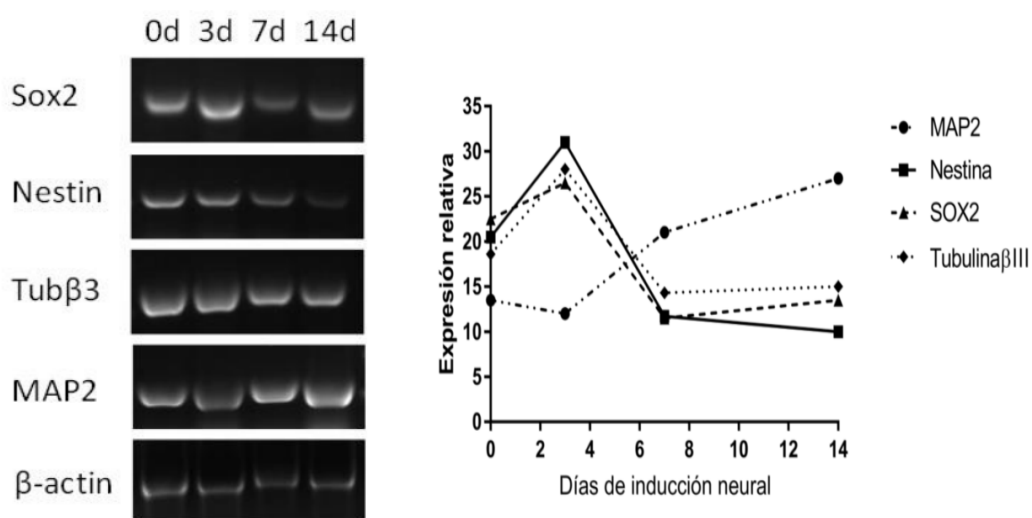
(a) *Control negativo*(b) *Cultivo diferenciado*

Figura 4.8: Expresión y cuantificación semicuantitativa de marcadores de troncalidad y diferenciación neural temprana por RT-PCR. **(a)** Expresión en gel de agarosa de genes de troncalidad SOX2, Nestina y marcadores de diferenciación neural TUB β III, MAP2 a los 0, 3 (pre-tratamiento), 7 y 14 días de inducción neural. **(b)** Gráfica de expresión relativa de genes de troncalidad y diferenciación neural temprana a través de los días de diferenciación.

Asimismo, se realizó la evaluación de la expresión de marcadores específicos a nivel de proteína a las células troncales con y sin inducción neural, empleando inmunofluorescencia por marcaje indirecto. Donde las hWJMSC sin tratamiento de inducción neural mostraron fuertemente la expresión de los marcadores de troncalidad SOX2 y Nestina, mientras que la expresión de Tubulina β III fue controversial, al coexistir en el mismo cultivo en poblaciones que expresaban fuertemente los marcadores de troncalidad y otras hWJMSC que no lo expresaban (figura 4.9). Mientras que las células tratadas con β FGF por 3 días y Forskolina por 14 días, con morfología tipo neural mostraron la ausencia del marcador SOX2, aunque la expresión de Nestina continuo durante el proceso de diferenciación. El marcador Tubulina β III se observó tanto en células con morfología tipo neural, y sin dicha morfología, pero se destacó un aumento de la intensidad en las células con la morfología tipo neural. Se evidenció también la expresión de marcadores indicativos de células tipo neurales, como MAP2 y TH, los cuales son marcadores ampliamente utilizados para la identificación de neuronas maduras. En la figura 4.10 se muestra de color verde la expresión de Tubulina β III y de color rojo los marcadores SOX2, Nestina, MAP2 y TH, para evitar confusión se muestra un marcador de color

4. RESULTADOS

rojo por *fila* y Tubulina β III en color verde, además de la compilación o *marge* de ambos marcadores expresados y DAPI para resaltar núcleos celulares, respaldando así la afirmación de que las células con la morfología tipo neural son las que expresan fuertemente los marcadores MAP2, Tubulina β III y TH, al igual que el mantenimiento de Nestina y la ausencia de SOX2 (indicativo de propiedades de troncalidad).

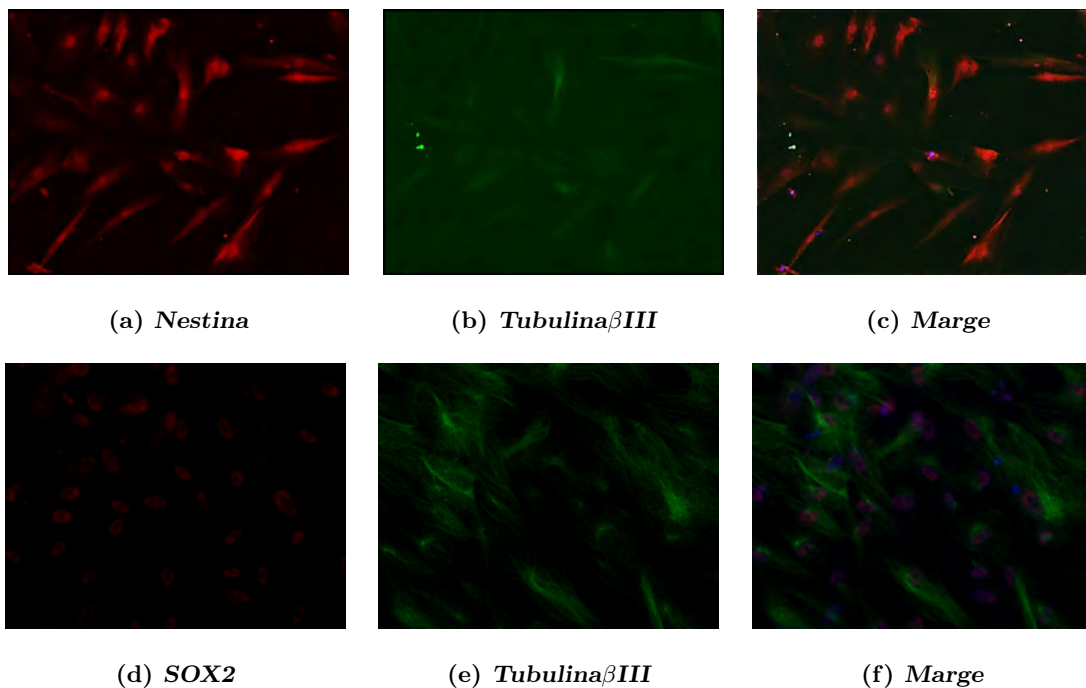


Figura 4.9: *hWJMSC sin inducción neural.* (a) Expresión positiva de Nestina en color rojo (Alexa Fluor 594). (b) Expresión positiva de Tubulina β III en color verde (Alexa Fluor 488). (c) Compilación de expresión de DAPI, Nestina y Tubulina β III. (d) Expresión positiva de SOX2 en rojo (Alexa Fluor 594). (e) Expresión positiva de Tubulina β III en verde (Alexa Fluor 488). (f) Compilación de expresión de DAPI, SOX2 y Tubulina β III. 100x

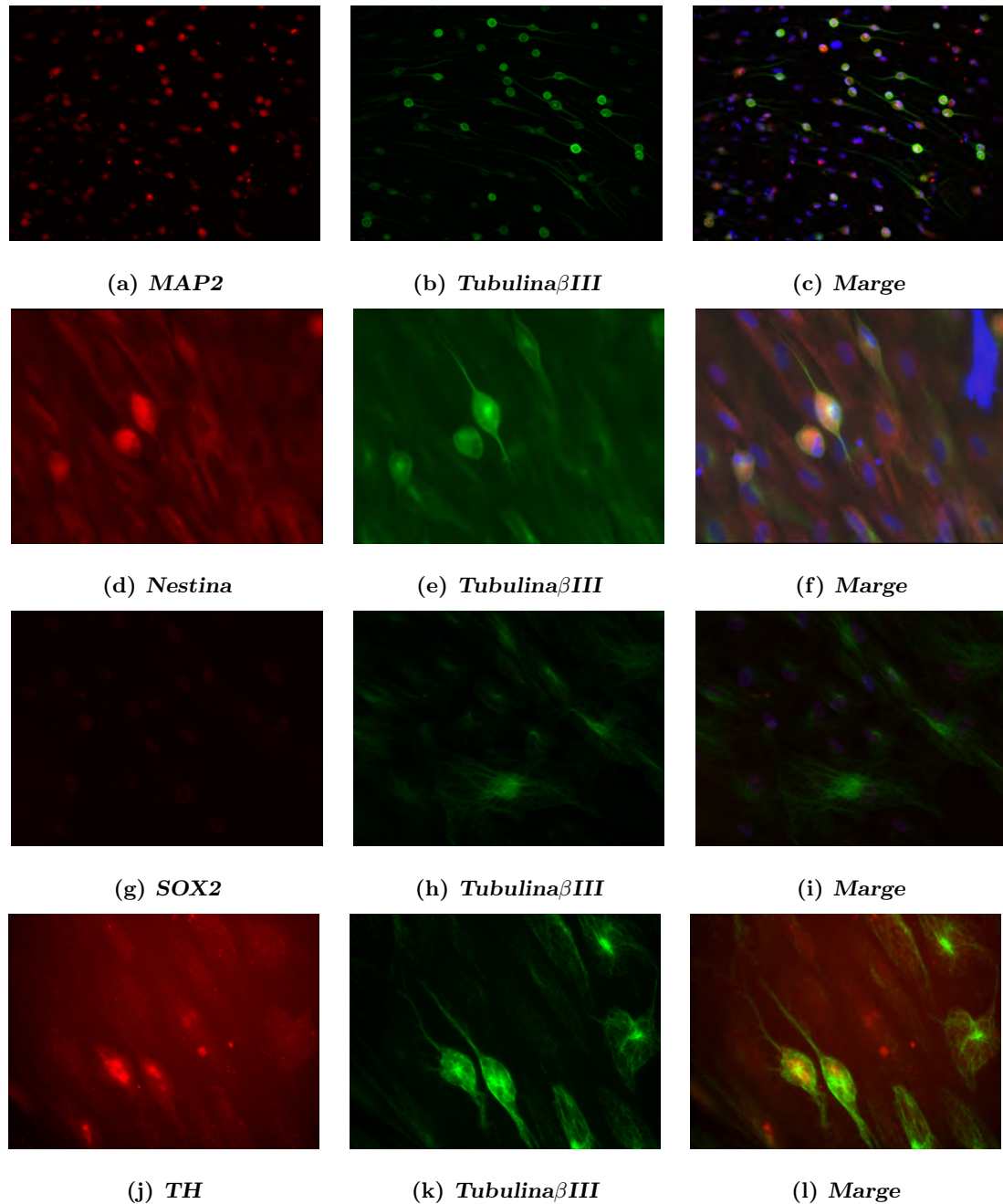


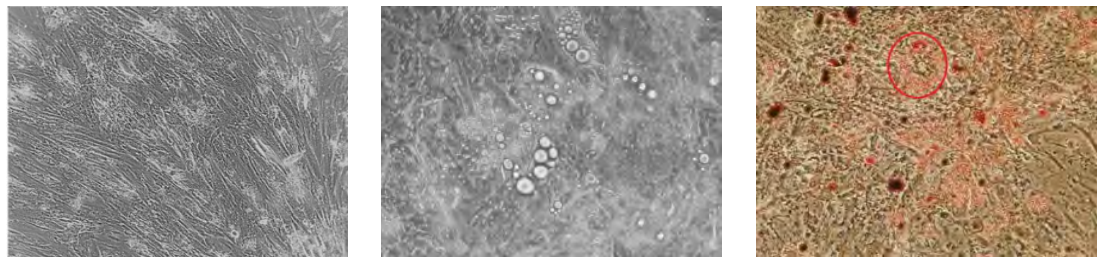
Figura 4.10: *hWJMSC con inducción neural.* (a) Expresión positiva de MAP2 en rojo (Alexa Fluor 594). (b, e, h, k) Expresión positiva de Tubulina β III en verde (Alexa Fluor 488). (c) Compilación de expresión de DAPI, MAP2 y Tubulina β III. (d) Expresión positiva de Nestina en rojo (Alexa Fluor 594). (f) Compilación de expresión de DAPI, Nestina y Tubulina β III. (g) No expresión de SOX2. (i) Compilación de expresión de DAPI y Tubulina β III. (j) Expresión positiva de TH en rojo (Alexa Fluor 594). (l) Compilación de expresión de DAPI, TH y Tubulina β III. 100x

4.5. Diferenciación adipogénica de hWJMSC

Para determinar la capacidad de diferenciación adipogénica de las hWJMSC, se realizaron experimentos de inducción de diferenciación adipogénica mediante el medio especializado *MesentCult Adipogenic Medium* por aproximadamente 40 días. Los resultados fueron visibles al aumentar el tamaño celular y formación de vacuolas de aspecto oleoso diminutas que conforme pasaban los días de inducción se agrupaban e iban aumentando su tamaño. Para visualizar dichas vacuolas intracelulares y confirmar el origen lipídico de éstas, se realizó tinción con rojo oleoso O, cabe mencionar que las vacuolas son características de células adiposas (figura 4.11, incisos a-c). Además, mediante RT-PCR de punto final, se evaluó de manera semicuantitativa la presencia del marcador de diferenciación adiposa PPAR γ , expresándose de manera evidente en las células con tratamiento de diferenciación respecto a las que no fueron tratadas. Para la cuantificación de la expresión relativa del gen PPAR γ , se utilizó como referencia el gen β -Actina, el cual es un gen constitutivo en las células con y sin diferenciación, evidenciando cualquier aumento en la expresión del marcador adiposo (figura 4.11, incisos d, e).

4.6. Diferenciación osteogénica de hWJMSC

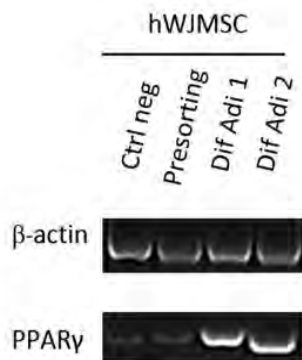
Para evaluar la capacidad de diferenciación osteogénica de las hWJMSC, se realizaron cultivos con presencia de Dexametasona, ácido ascórbico y β -Glicerofosfato. Mostrando que aquellos cultivos que estuvieron en interacción con dichos inductores por alrededor de 14 días, sufrieron cambios celulares, como la mineralización intracelular. Sin embargo, la estructura celular continuó siendo similar entre ensayos, por lo que utilizó tinción con *Alizarin Red S* para hacer visible la mineralización celular. Evidenciando que el cultivo con mineralización característica del tejido osteogénico se tiñe de color rojo a diferencia del control (figura 4.12).



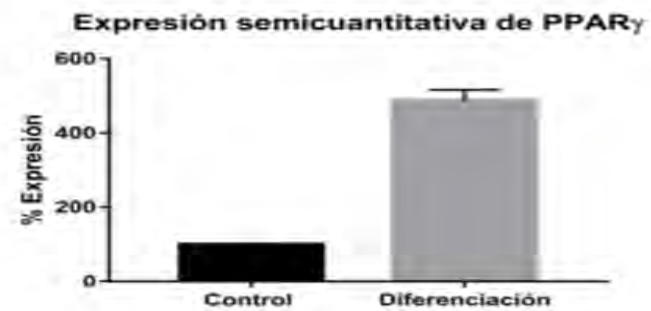
(a) hWJMSC control

(b) hWJMSC con diferenciación

(c) hWJMSC diferenciadas con tinción de rojo oleoso O



(d) Expresión de genes en gel de agarosa



(e) Expresión semicuantitativa de PPAR γ

Figura 4.11: Diferenciación adipogénica de hWJMSC (a) Células en medio MesentCult basal a 40x, sin cambio. (b) Células en medio suplementado con diferenciador adipogénico, destacando los depósitos de lípidos característicos de los adipocitos, a 40x. (c) Células diferenciadas con tinción de rojo oleoso O, destacando los depósitos de lípidos teñidos de color rojo, a 40x. (d) Gel de agarosa con los productos de la RT-PCR mostrando mediante bandas la expresión del gen β -Actin y PPAR γ en hWJMSC control negativo, células de la gelatina de Wharton y células con inducción de diferenciación adipogénica. (e) Gráfica de barras mostrando el aumento de la expresión relativa de PPAR γ por RT-PCR.

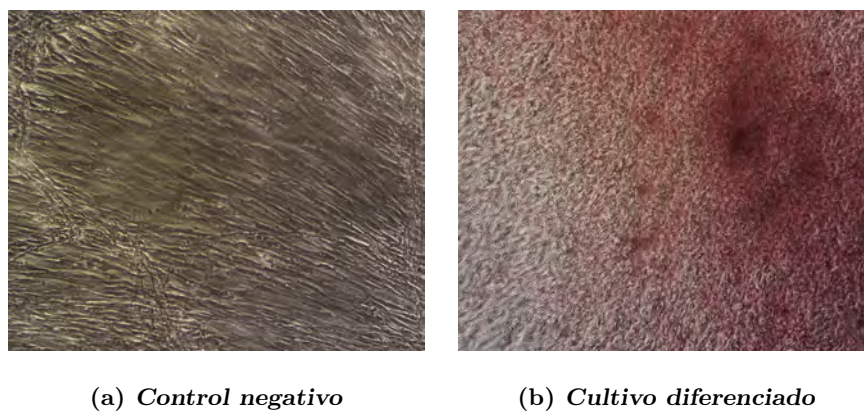


Figura 4.12: *Diferenciación osteogénica de hWJMSC.* (a) Cultivo de hWJMSC control negativo teñido con Alizarina a 100x. (b) Cultivo de hWJMSC después de inducción osteogénica, teñido con Alizarina a 100x. Observando que la mineralización en el cultivo se tiñe de color rojo.

4.7. Apoptosis de hWJMSC

Para determinar el grado de apoptosis de hWJMSC en condiciones de hiperglicemia, se realizaron ensayos a 2 y 24 horas con 40mM de D-Glucosa mediante la adición de Anexina V, IP y cuantificación por citometría de flujo. Se observó que en ambos cultivos de hWJMSC aumentó la apoptosis respecto a su control. Sin embargo, en el caso de las hWJMSC diabéticas se observó el aumento de la apoptosis a las 2 horas después de agregar 40mM de D-Glucosa y aunque a las 24 horas el porcentaje de aumento en la apoptosis es casi imperceptible, ésta fue mayor que el control. En el caso de las hWJMSC normoglicémicas también se observó una tendencia de mayor aumento en la apoptosis a las 2 horas que a las 24 horas después de estar en contacto con la glucosa. Es importante resaltar que la diferencia de 2h respecto al control no es significativa, así como tampoco lo es el aumento a las 24 horas (figura 4.13).

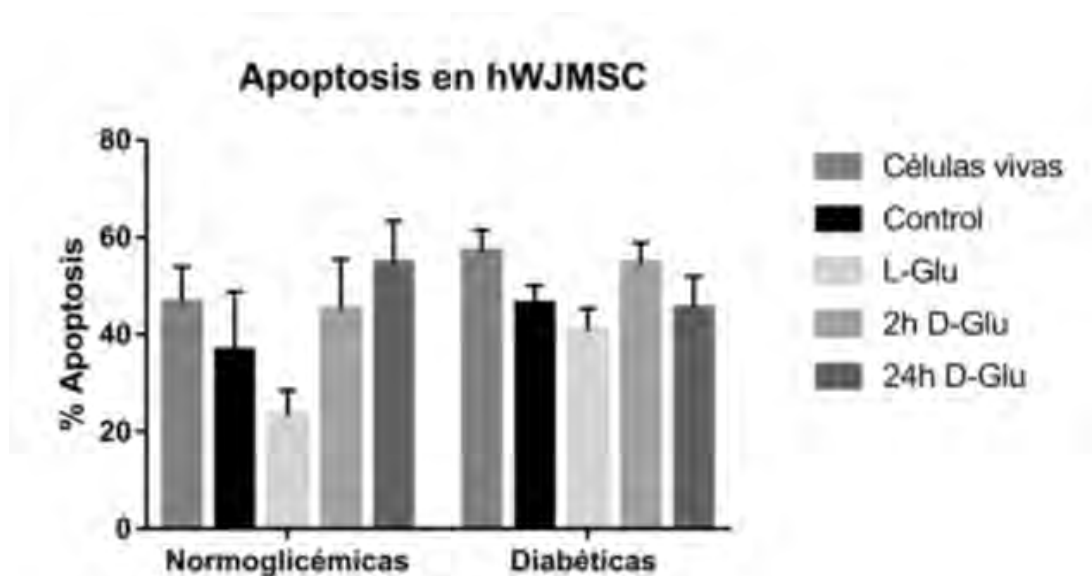


Figura 4.13: *Apoptosis en hWJMSC diabéticas y normoglicémicas.* Gráfica de barras que muestra el porcentaje de apoptosis de hWJMSC normoglicémicas y diabéticas con tratamientos de 40mM D-glucosa a 2 y 24 horas, además de un tratamiento con 40mM su respectivo control.

4.8. Expresión de genes proapoptóticos y de estrés oxidativo

Con el fin de conocer si las condiciones de hiperglicemia influyen en la expresión de genes específicos, se realizaron ensayos evaluando la expresión de los genes proapoptóticos BNIP3, p53 y los asociados a estrés oxidativo AMPK, HIF1 α en cultivos de hWJMSC en condiciones de hiperglicemia por 0, 0.5, 1, 2, 5, 24 y 48 horas con 40mM D-Glucosa. Con apoyo de RT-PCR, su respectiva electroforesis en gel de agarosa al 2% y semi-cuantificación con el software *ImageJ*, se analizaron y realizaron gráficas con los datos obtenidos para comparar el comportamiento de las células de hijos de madres normoglicémicas y diabéticas. En la figura 4.14 se muestran gráficas por gen comparando hWJMSC normoglicémicas (barras negras) contra diabéticas (barras rosas). Identificando una tendencia de aumento en la expresión relativa de todos los genes en los ensayos con hWJMSC provenientes de madres diabéticas en comparación con las normoglicémicas. Sin embargo, ésta diferencia no es significativa a excepción de AMPK a las 0.5 horas con tratamiento de glucosa. Visualmente los tratamientos a 0.5, 1 y 2

4. RESULTADOS

horas son los que tienen un mayor aumento en la expresión relativa de los genes, en su mayoría más elevado al control, seguido de la disminución de la expresión en los siguientes tratamientos (5, 24 y 48 horas). El gen que muestra cambios en la expresión relativa en más tratamientos es HIF1 α . La expresión mayormente alterada fue del gen AMPK a las 0.5 horas y el gen HIF1 α a 1 hora de agregar 40mM D-Glucosa.

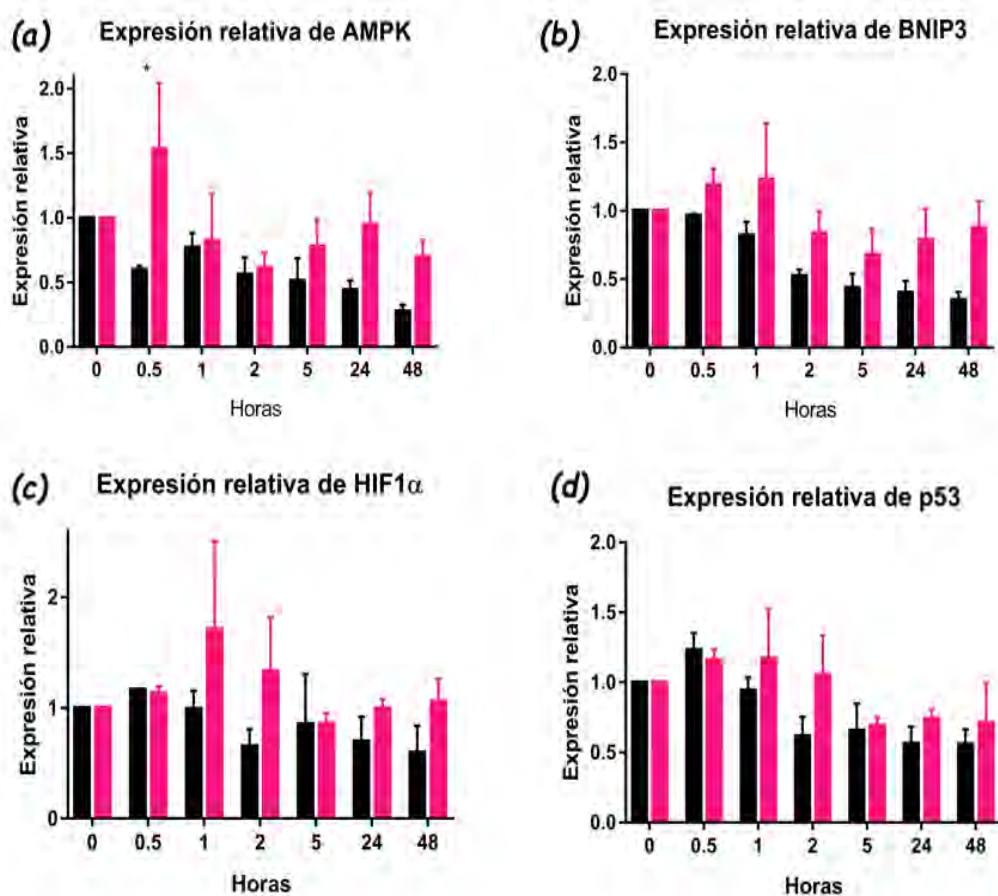


Figura 4.14: Gráficas de barras de expresión relativa de genes pro-apoptóticos y asociados al estrés oxidativo. Las barras negras ejemplifican hWJMSC de hijos de madres no diabéticas y las barras rosas de madres diabéticas. El primer par de barras por gráfica muestra las hWJMSC sin glucosa, mientras que los siguientes pares muestran ensayos con 40mM D-Glucosa por 0.5, 1, 2, 5, 24 y 48 horas respectivamente. ANOVA, $\alpha \leq 0.05$

Análisis de Resultados

La diabetes mellitus es una enfermedad con alta prevalencia en el mundo, principalmente en América y el Caribe. No obstante, el conocimiento que se tiene sobre ésta patología es insuficiente, puesto que no han existido progresos muy notorios en su entendimiento y tratamiento. El estudio de la diabetes durante la gestación ha sido realizada en modelos murinos *in vivo* y en modelos de células troncales neurales o de cresta neural *in vitro*. Al ser poco el conocimiento acerca del mecanismo en el humano, es de vital importancia generar un modelo para su estudio en humanos. Se piensa que las hWJMSC son un potencial modelo de investigación en humanos debido a sus características. Al ser la hiperglicemia una de las principales características de la DM, es importante conocer el efecto que éste estado pueda generar en las células, en este caso troncales mesenquimales.

El protocolo de aislamiento fue mediante explantes de la gelatina de Wharton, que se ubica en la zona perivascular del cordón umbilical, entre las arterias, vena umbilical y el epitelio de revestimiento. La gelatina de Wharton despertó el interés de investigadores al provenir de tejidos extraembrionarios y ser una prometedora alternativa a las HSC. No obstante, aún no existen métodos estandarizados de aislamiento, proliferación y caracterización que permitan reproducir un modelo celular con fines de investigación, entendimiento y aplicación clínica. Además, la región de interés para hWJMSC no ha sido estandarizada, ya que no se sabe si las poblaciones de células troncales dentro de las regiones del cordón umbilical son las mismas, puesto que no existe una demarcación clara histológicamente entre estas regiones (Kim et al., 2013).

Las células extraídas de la gelatina de Wharton mostraron dos poblaciones diferentes, siendo más evidente la diferencia entre poblaciones al comienzo de la migración celular de los explantes al plástico. Las células en mayor proporción en el cultivo poseían un fenotipo fibroblastoide doblemente espiculado con crecimiento en monocapa y distribución radial, característico de las MSC en cultivo *in vitro* (Batsali et al., 2013). Aunque, estaba la presencia de otra población con morfología epitelioide estrellada, con un bajo porcentaje que disminuía al aumentar la confluencia del cultivo. Esto, se piensa es debido al origen heterogéneo de los explantes a pesar de provenir de un mismo tejido, puesto que el cordón umbilical existen regiones intervasculares, amnio, subamnióticas y

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

perivasculares (Kim et al., 2013; Karahuseyinoglu et al., 2007). Es importante destacar que ésta metodología no necesita tratamientos enzimáticos y que al separar los vasos sanguíneos umbilicales de la gelatina de Wharton se disminuye la contaminación con células endoteliales y/o sanguíneas.

La caracterización de las células derivadas de la gelatina de Wharton en cultivo primario señaló la expresión positiva de los marcadores moleculares CD13, CD44, CD73, CD90 y CD105, los cuales se consideran los típicos expresados por las células troncales mesenquimales (Fong et al., 2010; Dehkordi et al., 2016). Mientras que para CD31 y CD45, la expresión se consideró negativa al ser menor al 4%. Se sabe que el marcador CD31, también conocido como PECAM-1, corresponde a una glicoproteína transmembranal de adhesión en células endoteliales (Park et al., 2015). Los marcadores CD34 y CD45, son proteínas asociadas a las células hematopoyéticas: en el caso de CD45, actúa como una proteína tirosina fosfatasa que se expresa en todos los leucocitos, principalmente en células T para la activación de éstas células (McPherson, 2012); CD34 es una proteína transmembranal glucosilada que se expresa en células troncales hematopoyéticas, con un papel de adhesión en la hematopoyésis temprana al mediar la unión de las células troncales a la matriz extracelular de la médula ósea o directamente a las células del estroma (UniProtKB, 2018). Conociendo esto, la ausencia de células con marcaje positivo para CD31 y CD45 nos dice que la presencia de células endoteliales y de origen hematopoyético es casi nula y que la expresión negativa de éstos marcadores en células CD13⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺ y CD105⁺, ratifica el modelo mínimo de caracterización en MSC. Sin embargo, CD34 presentó una expresión controversial, debido a que expresaba el marcador en aproximadamente 56 % de la población, pensando que podrían coexistir dos poblaciones con una relación de 50:50, una CD34⁺ y otra CD34⁻. Con el fin de enriquecer la población celular con células CD34⁻, ya que la ausencia de éste marcador ayuda a confirmar la caracterización de hMSCWJ, se realizó selección negativa de CD34 y posterior caracterización, mostrando que el marcador CD34 permanece presente en la población celular.

Dado que, CD34 es fuertemente asociado a HSC y células hematopoyéticas, es difícil de relacionar a dicho marcador con células no hematopoyéticas sin pensar en contaminación. Sin embargo, existe evidencia de que CD34 no sólo se puede expresar en MSC sino también en células musculares satélite, queratocitos corneales, células intersticiales, progenitores epiteliales y progenitores del endotelio vascular. En muchos casos, las células CD34 representan una pequeña proporción de la población celular total y también indican un subconjunto distinto de células con actividad progenitora potenciada (Sidney et al., 2014). La evidencia de que MSC es CD34⁻ se basa principalmente en MSC cultivadas, no en MSC residentes en tejido, además existe evidencia documentada de CD34⁻ en HSC (Donnelly et al., 1999). Por lo tanto, ni todas las MSC son CD34⁻ ni todas las HSC son CD34⁺. Estudios en MSC de diversos orígenes han observado una desaparición de la expresión de CD34 cuando las células se propagan en cultivo. Por lo tanto, la evidencia disponible apunta a que CD34 se expresa en las MSC residentes en tejido, y su hallazgo negativo es una consecuencia del cultivo celular (Lin et al., 2012). El conocimiento sobre las MSC CD34⁺ es pobre, por lo que no se podría afirmar si

modifica la función de las MSC, principalmente en el potencial de diferenciación.

A pesar de saber que CD34 podría fungir como marcador constitutivo de las MSC, se realizó una selección negativa de CD31, CD34 y CD45, para realizar la experimentación posterior. Considerando a las células aisladas como hWJMSC, a falta de análisis del potencial de diferenciación, se realizaron curvas de proliferación con tres medios: CHANG, DMEM10 % SFB y DMEMF12 %SFB. Mostrando mejor adaptación al medio CHANG y DMEMF12 10 % SFB, en contraste con el medio DMEM 10 % SFB, aunque éste último es uno de los medios más utilizados para la manipulación de éstas células (Mitchell et al., 2003; Wang et al., 2004; Conconi et al., 2006; Walecka et al., 2017). Sin embargo, se observó que el medio DMEMF12 10 % SFB no generaba condiciones estables en los cultivos, es decir, en algunos cultivos primarios la adaptación era muy rápida y en otros era demasiado lenta. Mientras que el medio CHANG generaba una adaptación rápida en cualquier cultivo primario, homogenizando los tiempos de proliferación y número de pasajes celulares en la experimentación. Es por eso que se consideró como el mejor medio para realizar la experimentación. El medio CHANG fue desarrollado para cultivos primarios de células de líquido amniótico humano para su uso en cariotipos y otras pruebas prenatales (CHANG Medium, 2018). Atribuyendo la mejor adaptación celular al medio CHANG, a que los medios para uso en cariotipos, generan la división celular para visualizar mayor número de metafases y por lo tanto cromosomas, aunado que está suplementado con suero fetal bovino y suero de ternera recién nacida. Sin embargo, no existe literatura que reporte el uso de éste medio para proliferar o mantener hWJMSC. Mientras que la mejor adaptación al medio DMEMF12 10 % SFB a diferencia del medio DMEM 10 % SFB, se piensa es debido a la mezcla del medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* con *Ham's Nutrient Mixture F-12* para el cultivo de células de mamíferos (DMEMF12 Medium, 2018).

La manera en que se evaluó la adaptación de las hWJMSC a los medios, fue mediante curvas de proliferación y TD. Las curvas de proliferación arrojaron que sólo el medio DMEM 10 %SFB tuvo una diferencia estadísticamente significativa con los medios CHANG y DMEMF12 en células normoglicémicas y diabéticas, siendo CHANG el medio con mayor proliferación seguido de DMEMF12, aunque entre éstos el comportamiento fue similar. Además, en los medios CHANG y DMEMF12 se observó disminución significativa de la proliferación en las células diabéticas respecto a las control. Sugiriendo que las condiciones hiperglicémicas si afectan la proliferación celular.

Asimismo, en los TD, el medio DMEM generó los mayores tiempos de duplicación, provocando la baja tasa de proliferación en las curvas. Los medios CHANG y DMEMF12 tuvieron un comportamiento similar, con un tiempo de duplicación de 23.1 horas en promedio, siendo muy cercano al reportado de 24.5 horas (Fong et al., 2010). Dentro del grupo de ensayos del medio CHANG, los tratamientos con 30 y 40mM D-Glu tuvieron diferencia significativa respecto a su control en las células normoglicémicas, es decir, el TD aumentó significativamente en éstos tratamientos con glucosa en comparación con el control del medio. Sin embargo, éste comportamiento no se presentó en los demás medios pero podría ser un indicio de un mayor efecto negativo de la hiperglicemia en hWJMSC normoglicémicas que en diabéticas.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El número de pasajes que se mantuvo el cultivo primario fue de aproximadamente 8, debido a que se ha reportado que las MSC pueden cultivarse *in vitro* por tiempo prolongado en estado indiferenciado y alcanzan un periodo de vida entre 15 y 50 duplicaciones celulares (aproximadamente 15 pases). Sin embargo, reciente se informó que existen modificaciones específicas de la expresión génica en WJMSC conforme se prolonga el cultivo hasta 12 pases celulares, sobreexpresando 157 genes y la regulación negativa de 440 genes relacionados con la respuesta inflamatoria, estrés celular, proliferación, maduración celular y apoptosis (Gatta et al., 2013). Se sabe que las MSC *in vitro* presentan un ciclo celular de tres fases durante el cultivo: 1) Fase de retraso, dura de 12 a 24 horas, las células reconstituyen el citoesqueleto y secretan proteínas de matriz extracelular para adherirse al plástico; 2) Fase Exponencial, donde la población celular se duplica, ocurriendo varias veces durante el cultivo y 3) Fase Estacionaria, momento idóneo para la inducción de la diferenciación celular al reducir su crecimiento (Pérez-Serrano et al., 2012). Aunque en éste caso, se necesiten métodos de cuantificación más sensibles y precisos, los resultados obtenidos dirigen el camino de la investigación para corroborar que la proliferación se ve modificada en medio hiperglicémico. Además de estandarizar medios de cultivo y metodología de mantenimiento y expansión celular que mantenga las características típicas de las MSC.

Estudios experimentales demuestran que la hiperglicemia afecta la proliferación celular durante la embriogénesis, como células de trofoblasto en el primer trimestre *in vitro* (Weiss et al., 2001), células de blastocisto *in vitro* o *in vivo* en roedores (Moley et al., 1998) y en el tubo neural de embriones en ratón (Fine et al., 1999). Recientemente, un grupo de investigadores (Fu et al., 2006) reportó que la concentración alta de glucosa induce disminución en la proliferación y aumenta la apoptosis de las NSC derivadas del telencéfalo de embriones de ratón. Sin embargo, se sabe poco sobre los efectos de la diabetes materna, particularmente la hiperglicemia, la proliferación y la muerte celular de las células troncales.

Para evaluar el potencial de diferenciación de las hWJMSC aisladas y confirmar el tercer y último criterio establecido por la ISCT, se realizó diferenciación en tres linajes celulares: neural, adipogénico y osteogénico. Es importante resaltar que, el linaje neural proviene de la capa germinal ectodérmica, mientras que el tejido adiposo, osteogénico y condrogénico provienen del mesodermo, de ahí el nombre *Mesenchymal Stem Cells*. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que puede inducirse con éxito para diferenciarse en linajes mesodérmicos y no mesodérmicos. Varios grupos de investigadores han demostrado que las MSC adquieren propiedades morfológicas y bioquímicas de las células neurales al exponerlas a medios de diferenciación apropiados (Mitchell et al., 2003; Karahuseyinoglu et al., 2007; Fu et al., 2006; Ma et al., 2005). En éste proyecto, la diferenciación neural fue inducida mediante 3 días con β FGF y 14 días con Forskolina, mostrando cambio morfológico típico de célula neuronal y la expresión de marcadores de células neurales (MAP2 y TUB β III) a nivel mRNA y proteína. Evidenciando que la exposición de MSC a factores químicos de inducción neural promueve la formación de cambios morfológicos que incluyen la retracción del citoplasma celular hacia el núcleo y la formación de elongaciones, mostrando morfologías neuronales bipolares y/o rami-

ficadas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que todavía falta la evidencia definitiva de la actividad electrofisiológica de las neuronas derivadas de hWJMSC. Por lo tanto, todavía está pendiente el problema de si el fenotipo tipo neuronal de hWJMSC refleja una trans-diferenciación genuina.

La metodología para diferenciación neural con Forskolina ha sido bastante replicada (Karahuseyinoglu et al., 2007), pero, el pre-tratamiento con β FGF, es menos común en las metodologías de inducción (Mitchell et al., 2003; Woodbury et al., 2000); aunque debido a sus resultados se ha potenciado su uso. El β FGF estimula la mantención del potencial de progenitores neuronales multipotenciales celulares, induciendo la formación de neuronas de tipo GABA enérgicas (Bithell et al., 2008). Del mismo modo β FGF promueve la proliferación y diferenciación celular activando el transporte de mRNA y aumentando la síntesis de proteínas, como también promoviendo el nivel de respuesta de las células al tratamiento de inducción neuronal y aumentando los niveles de expresión del gen marcador de precursores neuronales *Nestin* (Delcroix et al., 2010). Woodbury et al. han demostrado que la introducción de β FGF y EGF en la pre-inducción de diferenciación neuronal de MSC incrementa hasta un 50% la respuesta de las células a la inducción neuronal (2000). Por otro lado, la Forskolina, es un activador de adenilil ciclasa que inhibe la degradación de cAMP a AMP, lo que resulta en un aumento de los niveles de cAMP dentro de la célula. La diferenciación de las células neuronales puede ser inducida por un aumento en las concentraciones intracelulares de cAMP, el cual, a su vez activa vías de señalización específicas, que en última instancia conducen a la activación de factores de transcripción y genes implicados en el proceso de diferenciación (v.O. Hansen et al., 2003).

Adicionalmente, determinar la presencia de marcadores de troncalidad y diferenciación confirmaría el estado de las hWJMSC a diferentes tiempos de la inducción. Las hWJMSC sin inducción, expresaron los marcadores SOX2 y Nestina, que confirman el estado no diferenciado de las hWJMSC aisladas. Se conoce que Nestina es una proteína que se encuentra presente en los filamentos intermedios del citoesqueleto, cuya expresión está asociada a actividad citoplasmática en células progenitoras neuronales, en las cuales cumple una función de reorganización de microtúbulos durante el desarrollo neurogénico (Michalczyk and Ziman, 2005), empleándola como marcador del estado precursor neuronal en MSC (Woodbury et al., 2000). Mientras que en las células de mamífero, la multipotencialidad, está bajo control de algunos factores de transcripción, entre ellos Sox2, donde su expresión se modifica cuando la célula se compromete a un linaje celular específico iniciando la expresión de otros genes, manteniendo la auto-renovación de las MSC no diferenciadas (Pérez-Serrano et al., 2012).

Por otra parte, MAP2 es una proteína asociada a la maduración neuronal, que está presente en los microtúbulos predominantemente de neuronas y participa activamente en la polimerización de tubulina. Se presenta principalmente en microtúbulos de las dendritas neuronales, uniéndose a los dímeros de tubulina e inhibiendo su disociación, manteniendo así las prolongaciones celulares (Kalcheva et al., 1995). Debido a su activa participación en el ensamblaje de microtúbulos, función esencial de la neurogénesis, la expresión relativa de MAP2 se muestra ausente en el inicio de la inducción pero, a me-

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

didada que aumenta el tiempo se incrementa su expresión. Se esperaba que TUB β III se comportara similar que MAP2, puesto que es considerada un marcador de diferenciación neural, al pertenecer a uno de los seis isotipos de los polipéptidos de β -Tubulina y encontrarse en los ganglios del cerebro y de la raíz dorsal, específicamente en las neuronas, donde su expresión parece aumentar durante el crecimiento axonal (Karahuseyinoglu et al., 2007). Aunque TUB β III, disminuyó sus niveles de mRNA conforme pasaba el tiempo de inducción, las inmunofluorescencias muestran que a nivel de proteína TUB β III si se expresa y con una intensidad de fluorescencia alta, por lo que se recomienda corroborar la expresión a nivel de proteína por ensayos de Western blot .

Dentro de las principales características de las MSC, esta la capacidad de diferenciación en linajes mesodérmicos, por lo que se indujo diferenciación adiposa con ayuda del medio *MesencultTM Adipogenic Differentiation Medium (Human)*. Las moléculas inductoras de la diferenciación adiposa no están claras, ya que la composición del medio no especifica sus componentes. Aunque dentro de los agentes que se usan para promover la diferenciación adipogénica se encuentran dexametasona, insulina, isobutil metil xantina e indometacina, generando una acumulación de vacuolas ricas en lípidos dentro de las células y éstas expresan el receptor PPAR γ 2, la lipoproteína lipasa y la proteína aP2 de unión a ácidos grasos (Chamberlain et al., 2007). Conforme aumentó el tiempo de inducción, las vacuolas de lípidos se combinaron y llenaron las células. Dicha acumulación de lípidos es característica del tejido adiposo, por lo que se analizó histológicamente, después de 40 días de cultivo, mediante tinción con *Rojo Oleoso O*. Adicionalmente, se cuantificó la expresión relativa de PPAR γ , el cual es uno de los reguladores centrales de la adipogénesis, la supervivencia de los adipocitos maduros, la expresión de los genes que gobiernan la absorción de ácidos grasos, el almacenamiento de lípidos y la homeostasis energética sistemática (Jawerbaum and Capobianco, 2011), evidenciando así la diferenciación de hWJMSC en linaje adiposo.

La inducción en osteoblastos se generó mediante la adición de dexametasona, ácido ascórbico y β -Glicerofosfato a las hWJMSC por 14 días. Dexametasona es un glucocorticoide sintético, del cual no se conoce su mecanismo de acción con exactitud, sin embargo, se atribuye a efectos transcripcionales de BSP (Sialoproteína ósea), pero se ha informado que es un requisito esencial para la diferenciación de MSC en células osteoprogenitoras. El ácido ascórbico, juega un papel fundamental como cofactor para la hidroxilación de los residuos de lisina y prolina en el colágeno. Además de regular la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y mitosis, mientras que la ausencia de ácido ascórbico conduce a la reducida expresión de fosfatasa alcalina y a la inhibición del acúmulo de calcio. Por otra parte, β -GF funciona como una fuente importante de fosfatos inorgánicos que son esenciales para la mineralización de la matriz, ya que el β -GP es hidrolizado enzimáticamente por la fosfatasa alcalina convirtiéndose en la fuente primaria de las MSC para formar depósitos de calcio *in vitro* (Vater et al., 2011). La mineralización celular se visualizó mediante tinción con *Rojo de Alizarina S*, evidenciando la diferenciación en osteoblastos.

La acumulación de evidencia sugiere que las hWJMSC pueden generar con éxito la diferenciación en linajes mesodérmicos (adiposo y osteogénico) y no mesodérmicos

(neural), se debe considerar que falta corroborar la diferenciación en linaje condrogénico para cumplir los criterios propuestos por ISCT para las MSC. Asimismo, es importante resaltar que al diferenciarse no sólo en linaje mesodérmico, se muestra la naturaleza primitiva de las hWJMSC en comparación con otras células troncales derivadas de otros tejidos.

Dentro de los efectos reportados que provoca la hiperglicemia en las células se encuentra la muerte celular programada o apoptosis. En este proyecto, se observó mayor aumento de apoptosis a las 2h de permanecer en condiciones de hiperglicemia respecto a las 24h. Además de ser mayor el porcentaje de apoptosis en células provenientes de hijos de madres diabéticas que normoglicémicas.

Igualmente, se observó una tendencia similar en la expresión de genes pro-apoptóticos y asociados a estrés oxidativo, puesto que la expresión relativa de los genes BNIP3, p53 (pro-apoptóticos) y AMPK, HIF1 α (asociados a estrés oxidativo) aumenta entre las 0.5, 1 y 2 horas de exposición a condiciones de hiperglicemia y baja su expresión entre las 5, 24 y 48 horas. Aunque la diferencia entre la expresión de genes de las hWJMSC de origen de hijos de madres normoglicémicas y diabéticas no es significativo, se observa mayor expresión en las hWJMSC de origen diabético. Observando un mayor efecto negativo en hWJMSC normoglicémicas que diabéticas, puesto que la proliferación disminuyó, la apoptosis y la expresión de genes pro-apoptóticos y de estrés oxidativo aumentó en hWJMSC diabéticas.

Las malformaciones congénitas en la descendencia de madres diabéticas son el resultado de un proceso multifactorial. Se ha demostrado que la hiperglicemia *per se* es tóxica para ciertas poblaciones celulares pero los mecanismos por lo cuales actúa no son precisos aún. Los genes de los transportadores de glucosa GLUT1, 2 y 3, son regulados de manera negativa en estados de hiperglicemia, ocasionando incremento de la apoptosis en el blastocisto. Particularmente, GLUT2 se ha considerado como uno de los principales transportadores de glucosa durante la organogénesis en embriones de rata y responsable de los efectos en el embrión ocasionados por la diabetes materna ([Arteaga et al., 2008](#)). De hecho, se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el exceso de glucosa administrada al embrión es suficiente para inhibir la expresión de Pax3 e inducir la apoptosis neuroepitelial y DTN ([Fine et al., 1999](#)).

La muerte celular programada o apoptosis, es un evento celular controlado con precisión que puede desencadenarse por señales extracelulares u otros estímulos en condiciones normales y patológicas. En la mayoría de los casos, la apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, la degradación (fragmentación) del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos. Los factores intracelulares activados durante la apoptosis son los miembros de la familia Bcl-2, notablemente Bax y Bim. Cuando se inicia la apoptosis, Bax y Bim se activan. Bax activado se mueve a la mitocondria para formar un canal transmembrana con Bak, otro miembro de la familia Bcl-2. Bim se fosforila y se transloca a las mitocondrias para ayudar a abrir el canal Bax/Bak, lo que resulta en la liberación de citocromo C en el citosol. El citocromo C se une al factor 1 activador de la proteasa de la apoptosis y el complejo resultante activa Caspase-9, que a su vez activa a Caspase-3, que luego activa la DNAsa activada por caspasa y otros factores

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

pro-apoptóticos, lo que lleva a la fragmentación del ADN y la muerte celular (Yang et al., 2015).

La hiperglicemia podría aumentar la acumulación de p53, dando lugar a NTD. Una serie de estudios experimentales en embriones de murino, han demostrado que la apoptosis inducida por p53 esta mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) y que la apoptosis inducida por ROS era dependiente de p53 (Polyak et al., 1997). La hiperglicemia aumentó el estrés oxidativo en los embriones y provoca una mayor expresión de p53, lo que lleva a un aumento de la apoptosis neuroepitelial. Otros estudios han demostrado que ácido fólico podría reducir la producción de ROS y prevenir el daño del DNA inducido por el aumento del estrés oxidativo (Jia et al., 2008). Un estudio en embriones de ratones diabéticos que analizó los cambios moleculares mediante microarreglos de oligonucleótidos en la expresión de genes implicados en la morfogénesis y las funciones celulares mostró que el nivel de expresión de la mayoría de los genes que regulan la apoptosis incluye genes proapoptóticos como p53, BCL2/BNIP3 y Bid, están sobre-expresados en los tubos craneales de embriones de ratones diabéticos, además el análisis TUNEL mostró que el número de células apoptóticas aumentaba notablemente en neuroepitelios de embriones de ratones diabéticos, en comparación con embriones de ratones normales (Jiang et al., 2008).

El exceso de metabolismo de glucosa aumenta la producción de superóxido por la cadena de transporte de electrones; si estos radicales libres no son eliminados, se producirá estrés oxidativo, el cual modula los efectos de la glucosa alta para inhibir la expresión de Pax3, lo que induce la apoptosis (Chappell et al., 2009).

Estudios clínicos y experimentales demuestra que la hiperglicemia derivada de la DM conduce a la generación sostenida de ROS y al agotamiento de antioxidantes, lo que resulta en estrés oxidativo intracelular debido a un desequilibrio en la homeostasis de reducción-oxidación (redox) intracelular (Yang et al., 2015). En condiciones fisiológicas normales, los radicales libres de oxígeno, incluidos los radicales hidroxilo, los aniones superóxido, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se producen durante el metabolismo de la energía celular en las mitocondrias. Los niveles fisiológicos de ROS median la transducción de señal intracelular, que a su vez regula una amplia gama de funciones celulares, incluida la proliferación, la diferenciación y la migración (Raha and Robinson, 2001). Sin embargo, bajo condiciones patológicas, el exceso de ROS puede oxidar proteínas, lípidos y DNA, causando daño celular y muerte celular. La homeostasis redox intracelular depende del equilibrio relativo entre la producción de ROS y los buffer de tiol, glutatión (GSH) y tioredoxin. Normalmente, el entorno intracelular se mantiene en un estado altamente reducido, sin embargo, si la producción de ROS excede la capacidad de amortiguación celular, los agentes oxidantes se acumulan en la célula, causando daño y promoviendo el estrés oxidativo (Yang et al., 2015). Además del sistema de amortiguamiento mediante antioxidante GSH, las células también se protegen produciendo enzimas antioxidantes (AOEs), como las superóxido dismutasas, catalasa, y GSH peroxidasa, que convierten las ROS en moléculas no tóxicas (Arteaga et al., 2008).

En periodo de gestación, el incremento de la masa celular causa un estado fisiológico

de hipoxia que lleva a la activación de genes que inducen la formación del sistema circulatorio fetal. HIF1 α media la adaptación de las células a bajas tensiones de oxígeno, está regulado precisamente por hipoxia e hiperglicemia. Entre HIF1 α y la glucosa a veces pueden influirse mutuamente, ya sea porque HIF1 α induce la expresión de enzimas glucolíticas y el metabolismo de la glucosa afecta la acumulación de HIF1 α en algunas células (Xiao et al., 2013).

La generación mitocondrial de H₂O₂ también puede estimular a AMPK a través de la producción del radical hidroxilo (OH⁻). La AMPK activada puede translocarse al núcleo y regular la expresión génica fosforilando las proteínas nucleares como p300, HNF4 α , TRIP6, NRF-1, TC45, PGC-1 α , histona deacetilasa 5 y HIF-1 α (Wu et al., 2012). Por lo tanto, AMPK podría mediar en los efectos del estrés oxidativo resultante de la hiperglicemia materna al alterar la expresión de genes específicos.

Esto, nos lleva a sugerir que al existir condiciones de hiperglicemia los genes involucrados en estrés oxidativo, AMPK y HIF1 α , aumentan su expresión debido al metabolismo acelerado de la glucosa, desencadenando activación de cascadas de señalización asociadas a genes como BNIP3 y p53, generando apoptosis celular. La proliferación celular y la muerte celular son mecanismos importantes que subyacen a las malformaciones en bebés nacidos de madres diabéticas. Varios estudios informan un aumento del estrés oxidativo en los embriones en un entorno diabético, y la administración de antioxidantes, como las vitaminas C o E, puede reducir la aparición de defectos del desarrollo (Pavlinkova et al., 2009).

Conclusiones

Las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano pueden ser aisladas mediante explantes sin uso de enzimas de manera exitosa. Al provenir de un tejido de desecho después del parto, las células aisladas tienen como ventaja su fácil obtención, rápida manipulación, metodología con bajos costos y con menos consideraciones bioéticas o legales implicadas en su uso. Dichas células, cumplen la morfología fibroblastoide biespiculada, inmunofenotipo $CD13^+$, $CD31^-$, $CD34^{-*}$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$ y potencial de diferenciación en linaje mesodérmico y no mesodérmico, que junto con la adherencia al plástico cumple los criterios establecidos por las ISCT, para ser consideradas MSC.

El mejor medio para el aislamiento, proliferación y mantenimiento de las hWJMSC fue el medio CHANG, superando al medio DMEF12 y DMEM. El tiempo de duplicación para las hWJMSC de origen normoglicémico fue de 23.1 horas. La proliferación de las hWJMSC es menor en hWJMSC diabéticas que en normoglicémicas. Las hWJMSC se diferenciaron en linaje neural, expresando marcadores como Nestina y SOX2 en estado indiferenciado y, TUB β III y MAP2 en estado diferenciado en conjunto con morfología neuronal. También se diferenciaron en linaje mesodérmico: adiposo con expresión de PPAR γ y morfología típica de adipocito, así como en osteoblastos visualizando la mineralización celular. Finalmente, las hWJMSC tienen mayor porcentaje de apoptosis a las 2 horas de estar en condiciones hiperglicémicas que a las 24 horas y aumenta la expresión relativa de los genes BNIP3, p53 (pro-apoptóticos) y AMPK, HIF1 α en hWJMSC diabéticas que en normoglicémicas. Sugiriendo que la glucosa genera efectos citotóxicos sobre las hWJMSC.

Perspectivas

- Generar metodología estandarizada y especializada para enriquecer la población celular del inmunofenotipo de las hWJMSC, suponiendo que las MsC deben ser CD34⁻ aunque también podría estudiarse si CD34 puede ser un marcador constitutivo de las MSC.
- Determinar los pasajes máximos que mantienen las propiedades de las hWJMSC *in vitro*.
- Determinar metodología adecuada para analizar la proliferación celular de manera más precisa, como incorporación de BrdU o citometría de flujo.
- Realizar la inducción en linaje condrogénico, con el fin de corroborar su potencial de diferenciación en linaje mesodérmico.
- Determinar más marcadores de diferenciación a nivel mRNA y proteína en todos los linajes inducidos con el fin de corroborar la diferenciación exitosa.
- Aumentar el número de réplicas biológicas y técnicas Realizar más ensayos en hWJMSC normoglicémicas y diabéticas en condiciones hiperglicémicas para analizar su porcentaje de apoptosis y expresión relativa de genes asociados a estrés oxidativo. Incluso aumentar el número de genes estudiados para conocer el mecanismo por el cual se ven modificadas las células.

Referencias

- [1] ADA (2017). <http://www.diabetes.org/>, abril de 2017. [5](#), [6](#)
- [2] Allers, C., Sierralta, W., Neubauer, S., Rivera, F., Minguell, J., and Conget, P. (2004). Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*, 78:503–508. [29](#)
- [3] Araya, R. (2009). Diabetes y embarazo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 20(5):614–629. [xv](#), [xv](#), [9](#), [10](#), [11](#)
- [4] Arredondo, A. A., Barquera, S., Cisneros, N., Ascencio, I. d. J., Encarnación, L. M., Larrañaga, A. M., and Sakkal, G. (2016). Asumiendo el control de la diabetes. México. *Fundación Mídete*, 1(72):56. [7](#), [9](#)
- [5] Arteaga, J., Luna, L., and Mutchinick, O. M. (2008). Diabetes, embarazo y defectos al nacimiento. *Revista de Investigacion Clínica*, 60(2):107–114. [10](#), [65](#), [66](#)
- [6] Ashman, L. K. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10):1037–1051. [29](#)
- [7] Ashton, B., Allen, T., Howlett, C., Eaglesom, C., Hattori, A., and Owen, M. (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*, 14(151):294–307. [25](#)
- [8] Batsali, A. K., Kastrinaki, M.-C., Papadaki, H. a., and Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal stem cells derived from Wharton’s Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current stem cell research & therapy*, 8(2):144–55. [xv](#), [xv](#), [xv](#), [xv](#), [21](#), [22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [28](#), [32](#), [59](#)
- [9] Bithell, A., Finch, S. E., Hornby, M. F., and Williams, B. P. (2008). Fibroblast Growth Factor 2 Maintains the Neurogenic Capacity of Embryonic Neural Progenitor Cells In Vitro but Changes Their Neuronal Subtype Specification. *Stem Cells*, 26(6):1565–1574. [63](#)

REFERENCIAS

- [10] Blanc, K. L. and Ringde, O. (2003). Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. pages 11–20. [27](#)
- [11] Campard, D., Lysy, P. A., Najimi, M., and Sokal, E. M. (2008). Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology*, 134(3):833–848. [25](#)
- [12] Carlson, B. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. Elsevier, 5a edition. [17](#), [18](#)
- [13] Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25(11):2739–2749. [27](#), [64](#)
- [14] Chang, T. I., Horal, M., Jain, S. K., Wang, F., Patel, R., and Loeken, M. R. (2003). Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia*, 46(4):538–45. [13](#)
- [15] CHANG Medium (2018). <http://www.irvinesci.com/products/>, Enero de 2018. [61](#)
- [16] Chappell, J. H., Wang, X. D., and Loeken, M. R. (2009). Diabetes and apoptosis: Neural crest cells and neural tube. *Apoptosis*, 14(12):1472–1483. [66](#)
- [17] Chen, M., Lie, P., Li, Z., and Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.*, 37(5):629–40. [25](#)
- [18] Clapés, S., Fernández, T., and Suárez, G. (2013). Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. *MEDICC review*, 15(1):37–40. [xv](#), [12](#), [13](#), [15](#)
- [19] Clausen, T. D., Mortensen, E. L., Schmidt, L., Mathiesen, E. R., Hansen, T., Jensen, D. M., and Damm, P. (2013). Cognitive Function in Adult Offspring of Women with Gestational Diabetes-The Role of Glucose and Other Factors. *PLoS ONE*, 8(6):2–9. [10](#)
- [20] Conconi, M. T., Burra, P., Di Liddo, R., Calore, C., Turetta, M., Bellini, S., Bo, P., Nussdorfer, G. G., and Parnigotto, P. P. (2006). CD105(+) cells from Wharton’s jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(6):1089–1096. [25](#), [46](#), [61](#)
- [21] Dehkordi, M., Madjd, Z., Chaleshtori, M., Meshkani, R., Nikfarjam, L., and Kajbafzadeh, A.-M. (2016). A simple, rapid, and efficient method for isolating mesenchymal stem cells from the entire umbilical cord. *Cell Transplantation*, 25(7):1287–1297. [31](#), [60](#)

-
- [22] Delcroix, G. J. R., Curtis, K. M., Schiller, P. C., and Montero-Menei, C. N. (2010). EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation*, 80(4-5):213–227. 63
- [23] DMEFM12 Medium (2018). <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/dme-f12.html>, Enero de 2018. 61
- [24] Donnelly, D. S., Zelterman, D., Sharkis, S., and Krause, D. S. (1999). Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. *Experimental hematology*, 27(5):788–96. 60
- [25] Dumm, C. (2003). *Embriología humana: atlas y texto*. El Ateneo. xv, xv, 21
- [26] Ferres, E., Montesinos, M., and Smith-Agreda, V. (2017). Apuntes de Embriología Humana. *Medicina*, 1:1–270. xv, xv, xv, xv, 18, 19
- [27] Fine, E. L., Horal, M., Chang, T. I., Fortin, G., and Loeken, M. R. (1999). Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes*, 48(12):2454–62. 62, 65
- [28] Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., and Mayani, H. (2004). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 56(2):153–168. 22, 26, 27, 30
- [29] Fong, C. Y., Subramanian, A., Biswas, A., Gauthaman, K., Srikanth, P., Hande, M. P., and Bongso, A. (2010). Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton’s jelly stem cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(3):391–401. 22, 23, 60, 61
- [30] Friedenstein, A., Petrakova, K., Kurolesova, A., and Frolova, G. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 14(6):230–47. 25
- [31] Fu, J., Tay, S. S. W., Ling, E. A., and Dheen, S. T. (2006). High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*, 49(5):1027–1038. 62
- [32] Gallo, L. A., Barrett, H. L., and Dekker Nitert, M. (2017). Review: Placental transport and metabolism of energy substrates in maternal obesity and diabetes. *Placenta*, 54:59–67. 11
- [33] Gatta, V., D’Aurora, M., Lanuti, P., Pierdomenico, L., Sperduti, S., Palka, G., Gesi, M., Marchisio, M., Miscia, S., and Stuppia, L. (2013). Gene expression modifications in Wharton’s Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing. *BMC genomics*, 14:635. 62
- [34] Greider, C. and Blackburn, E. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(26):331–337. 29
-

REFERENCIAS

- [35] Harris, M. J. and Juriloff, D. M. (2010). An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 88(8):653–669. [13](#)
- [36] Haynesworth, S., Baber, M., and Caplan, A. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13(11):69–80. [25](#)
- [37] Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Mees, B., and Schaper, W. (2004). A Different Outlook on the Role of Bone Marrow Stem Cells in Vascular Growth. *Circulation Research*, 94:573–575. [29](#)
- [38] IDF (2015). North America and Caribbean, enero de 2017. [xv](#), [xv](#), [3](#), [7](#), [8](#)
- [39] Indians, P. and Indians, P. (2008). High Prevalence of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes in Adult Offspring of Women With Gestational Diabetes The role of intra-uterine hyperglycemia. *10*, 31(2). [9](#)
- [40] Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(3s):245–254. [15](#)
- [41] Jawerbaum, A. and Capobianco, E. (2011). Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: Implications in maternal diabetes. *Placenta*, 32(SUPPL. 2):S212–S217. [64](#)
- [42] Jia, D.-y., Liu, H.-j., Wang, F.-w., Liu, S.-m., Ling, E.-A., Liu, K., and Hao, A.-j. (2008). Folic acid supplementation affects apoptosis and differentiation of embryonic neural stem cells exposed to high glucose. *Neuroscience letters*, 440:27–31. [13](#), [66](#)
- [43] Jiang, B., Kumar, S. D., Loh, W. T., Manikandan, J., Ling, E. A., Tay, S. S., and Dheen, S. T. (2008). Global gene expression analysis of cranial neural tubes in embryos of diabetic mice. *Journal of Neuroscience Research*, 86(16):3481–3493. [14](#), [66](#)
- [44] Kalcheva, N., Albala, J., O’Guin, K., Rubino, H., Garner, C., and Shafit-Zagardo, B. (1995). Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24):10894–8. [63](#)
- [45] Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., Uckan, D., and Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2):319–331. [60](#), [62](#), [63](#), [64](#)
- [46] Kim, D.-W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., and Borlongan, C. V. (2013). Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic

- characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *International journal of molecular sciences*, 14(6):11692–712. 25, 59, 60
- [47] Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. 101(9):3722–3729. 27
- [48] Lazarus, H., Haynesworth, S., Gerson, S., Rosenthal, N., and Caplan (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*, 4(16):557–564. 29
- [49] Li, R., Chase, M., Jung, S.-K., Smith, P. J. S., and Loeken, M. R. (2005). Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 289(4):E591–9. 12
- [50] Liang, J., Wu, S., Zhao, H., Li, S. L., Liu, Z. X., Wu, J., and Zhou, L. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton’s jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. *Neuroscience Letters*, 532(1):59–63. 26
- [51] Liechty, K., MacKenzie, T., Shaaban, A., Radu, A., Moseley, A., Deans, R., Mars-hak, D., and Flake, A. (2001). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site- specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature*, 6(11):1282–1286. 29
- [52] Lin, C. S., Ning, H., Lin, G., and Lue, T. F. (2012). Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*, 14(10):1159–1163. 60
- [53] Ma, L., Feng, X.-y., Cui, B.-l., Law, F., Jiang, X.-w., Yang, L.-Y., Xie, Q.-d., and Huang, T.-h. (2005). Human umbilical cord Wharton’s Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chinese medical journal*, 118(23):1987–93. 62
- [54] Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M. J., Dennis, J., Haynesworth, S. E., and Koc, O. N. (2004). Mesenchymal stem cells Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. pages 597–604. 29
- [55] Mauney, J., Volloch, V., and Kaplan, D. (2005). Role of Adult Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue. *Tissue Engineering*, 11(5):787–802. 30
- [56] McPherson, G. (2012). *Inmunología: conceptos y evidencias*. McGraw Hill México. 60
- [57] Meeker, A. and Coffey, D. (1997). Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry (Mosc)*., 62(11):1323–1331. 29

REFERENCIAS

- [58] Meruane, M., Rojas, M., Tissue, A., and Stem, D. (2010). Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo. *International Journal of Morphology*, 28(3):879–889. [23](#)
- [59] Michalczyk, K. and Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histology and histopathology*, 20(2):665–71. [63](#)
- [60] Mills, J. L., Baker, L., and Goldman, A. S. (1979). Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment. *Diabetes*, 28(4):292–293. [11](#)
- [61] Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., and Troyer, D. (2003). Matrix Cells from Wharton’s Jelly Form Neurons and Glia. *Stem Cells*, 21(1):50–60. [26](#), [29](#), [46](#), [61](#), [62](#), [63](#)
- [62] Moley, K., Chi, M.-Y., Knudson, C., Korsmeyer, S., and Mueckler, M. (1998). Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Medicine*, 4(12):1421–1424. [62](#)
- [63] Moore, K., Persaud, T., and Torchia, M. (2013). *Embriología clínica*. Elsevier Saunders, 9a edition. [20](#)
- [64] Network, S. I. G. (2013). *Management of diabetes: a national clinical guideline*. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. [11](#)
- [65] Nicola, M. D., Carlo-stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A. M. (2017). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *99(10):3838–3844*. [27](#)
- [66] NIH-NIDDK (2017). <https://www.niddk.nih.gov/>, febrero de 2017. [5](#)
- [67] Park, S., Sorenson, C. M., and Sheibani, N. (2015). PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clinical science (London, England : 1979)*, 129(3):217–34. [60](#)
- [68] Pavlinkova, G., Salbaum, J. M., and Kappen, C. (2009). Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC genomics*, 10:274. [xv](#), [xv](#), [13](#), [14](#), [67](#)
- [69] Perdikogianni, C., Dimitriou, H., Stiakaki, E., Martimianaki, G., and Kalmanti, M. (2008). Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use? *Cytotherapy*, 10(5):452–459. [22](#), [23](#)
- [70] Pereira, R., Halford, K., O’Hara, M., Leeper, D., Sokolov, B., Pollard, M., Bagasra, O., and Prockop, D. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(11):4857–61. [25](#)

-
- [71] Pérez-Serrano, R. M., Ramírez-Espinosa, J. J., Shimada, A., Antaramian, A., Piña, E., and Mora, O. (2012). Células troncales mesenquimales: biología, caracterización y futuras aplicaciones en salud y producción de especies pecuarias. Parte I. *Agrociencia*, 46(4):371–382. [62](#), [63](#)
- [72] Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M., Simonetti, D., Craig, S., and Marshak, D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 5411(284):143–7. [25](#)
- [73] Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389(6648):300–305. [66](#)
- [74] Raha, S. and Robinson, B. H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American Journal of Medical Genetics*, 106(1):62–70. [66](#)
- [75] Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052):1707–1710. [26](#)
- [76] Rodríguez-Pardo, V. M., Fuentes-Lacouture, M. F., Aristizabal-Castellanos, J. A., Paul, J., and Hernandez, V. (2010). Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*, 15(3):224–239. [22](#), [23](#), [26](#)
- [77] Rojas, M., Montenegro, M. A., Domínguez, S., Concha, M., Fuenzalida, M., Bosco, C., Rodríguez, A., and Venegas, F. (2007). Embriología humana. *Universidad de Chile, Facultad de Medicina*, 1(Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo):1–98. [17](#), [19](#), [20](#), [21](#), [24](#)
- [78] Seshi, B., Kumar, S., and King, D. (2003). Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis*, 31(2):268–85. [26](#)
- [79] Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., and Hopkinson, A. (2014). Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells*, 32:1380–1389. [60](#)
- [80] Stančáková, A. (2016). Genetics of Type 2 Diabetes. 31:203–220. [6](#), [16](#)
- [81] Sukanya, S., Bay, B. H., Tay, S. S. W., and Dheen, S. T. (2012). Frontiers in research on maternal diabetes-induced neural tube defects: Past, present and future. *World journal of diabetes*, 3(12):196–200. [16](#)
- [82] Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., Linscheid, P., Christ-Crain, M., Keller, U., Müller, B., and Zulewski, H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4):1135–1140. [25](#)
-

REFERENCIAS

- [83] Tremain, N., Korkko, J., Ibberson, D., Kopen, G., DiGirolamo, C., and Phinney, D. (2001). MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*, 92(5):408–18. [26](#)
- [84] UniProtKB (2018). CD34 - Hematopoietic progenitor cell antigen CD34 precursor - Homo sapiens (Human). [60](#)
- [85] Vater, C., Kasten, P., and Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2):463–477. [64](#)
- [86] Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Fraser, D. D., and Weiss, S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron*, 11(5):951–966. [26](#)
- [87] v.O. Hansen, T., Rehfeld, J. F., and Nielsen, F. C. (2003). KCl potentiates forskolin-induced PC12 cell neurite outgrowth via protein kinase A and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Neuroscience Letters*, 347(1):57–61. [63](#)
- [88] Walecka, I., Gil-Kulik, P., Krzyżanowski, A., Czop, M., Galkowski, D., Karwat, J., Chomik, P., Świstowska, M., Kwaśniewska, A., Bogucka-Kocka, A., and Kocki, J. (2017). Phenotypic Characterization of Adherent Cells Population CD34+ CD90+ CD105+ Derived from Wharton’s Jelly. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 23:1886–1895. [47](#), [61](#)
- [89] Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12):5510–5514. [13](#)
- [90] Wang, H., Hung, S., Peng, S., Huang, C., Wei, H., Guo, Y., Fu, Y., Lai, M., and Chen, C. (2004). Mesenchymal Stem Cells in the Wharton’s Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, 22(7):1330–1337. [46](#), [61](#)
- [91] Weiss, U., Cervar, M., Puerstner, P., Schmut, O., Haas, J., Mauschitz, R., Aarikan, G., and Desoye, G. (2001). Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia*, 44(2):209–219. [62](#)
- [92] WHO (2016). Global Report on Diabetes. 978:88. [6](#)
- [93] Williamson, M. and Snyder, L. (2012). *Interpretacion Clinica de Pruebas Diagnosticas de Wallach / Wallach Interpretation of Clinical Diagnostic Tests*. Wolter Kluwer Health. [XIX](#), [XIX](#), [7](#)
- [94] Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., and Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61(4):364–370. [63](#)

-
- [95] Wright, W., Piatyszek, M., Rainey, W., Byrd, W., and Shay, J. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics*, 18(2):173–179. [27](#)
- [96] Wu, G., Bazer, F. W., Cudd, T. a., Meininger, C. J., and Spencer, T. E. (2004). Recent Advances in Nutritional Sciences Maternal Nutrition and Fetal. *Amino Acids*, 1(13):2169–2172. [16](#)
- [97] Wu, L., Wang, N., Liu, Y., and Wei, X. (2009). Differentiation of Wharton’s jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 15(10):2865–73. [25](#)
- [98] Wu, Y., Viana, M., Thirumangalathu, S., and Loeken, M. R. (2012). AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetologia*, 55(1):245–54. [13](#), [67](#)
- [99] Xiao, H., Gu, Z., Wang, G., and Zhao, T. (2013). The possible mechanisms underlying the impairment of hif-1?? pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies. *International Journal of Medical Sciences*, 10(10):1412–1421. [14](#), [67](#)
- [100] Yang, P., Albert Reece, E., Wang, F., and Gabbay-Benziv, R. (2015). Decoding the oxidative stress hypothesis in diabetic embryopathy through proapoptotic kinase signaling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(5):569–579. [11](#), [15](#), [66](#)
- [101] Zhang, L., Tan, X., Dong, C., Zou, L., Zhao, H., Zhang, X., Tian, M., and Jin, G. (2012). In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton’s jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30(6):471–477. [26](#)