

EFFECTOS DEL MANGANESO SOBRE CULTIVOS DE CÉLULAS HUMANAS EN CONDICIONES DE HIPERGLUCEMIA

Luis Alberto Haro Durand MSc., PhD.

Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular IByME-CONICET. E-mail: harodurand.luis@gmail.com

Introducción

El desarrollo de heridas crónicas es una complicación frecuente en pacientes diabéticos. Una de las principales causas de esta complicación es el fallo en el proceso normal de reparación tisular asociada a una angiogénesis disminuida que se manifiesta principalmente por disfunción endotelial y de fibroblastos debido a hiperglucemia crónica. En este sentido es de interés biomédico el estudio de diferentes alternativas terapéuticas destinadas a favorecer el proceso reparativo de tejidos vascularizados en pacientes diabéticos. El manganeso (Mn^{2+}) es un ión bioactivo que cumple una importante función en condiciones de estrés oxidativo, ya que es un cofactor esencial de la principal enzima antioxidante mitocondrial SOD, que convierte al superóxido en peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y a este en oxígeno molecular (O_2). Se ha propuesto que el Mn^{2+} , además, tendría función en procesos de reparación de tejidos, pero los trabajos relacionados son muy escasos y aun no existen estudios que evalúen el potencial proangiogénico y expliquen los mecanismos celulares y moleculares por medio de los cuales el Mn^{2+} podría modular la respuesta de las células endoteliales y fibroblastos y contribuir así al éxito del proceso reparativo bajo condiciones de HG crónica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial reparativo *in vitro* de iones Mn^{2+} sobre cultivos primarios de células endoteliales (HUVECs) y fibroblastos dérmicos (DFs) sometidos a HG (35 mmol/L D-Glucosa).

Metodología

La disfunción celular que experimentan las células endoteliales y fibroblastos debido a hiperglucemia crónica, se manifiesta principalmente como: alteración y arresto del ciclo celular, pérdida de la capacidad de migración, insensibilidad a factores de crecimiento y apoptosis patológica.

Respuesta celular: células endoteliales (HUVECS) y fibroblastos dérmicos (DFs) fueron crecidos en condiciones de hiperglucemia (HG: 35 mmol/L D-glucosa), durante 7 días y luego estimulados con 100 μ mol/L de $MnCl_2$. La capacidad reparativa *in vitro* se estudió mediante ensayos de proliferación, migración y formación de túbulos sobre Geltrex™. Se analizó, también, el aspecto celular de fibroblastos; forma y apariencia como indicadores del estado de salud celular. Como controles se utilizó: 5.5 mmol/L de D-glucosa (control normoglucémico), NaCl, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Factor de necrosis tumoral (TNF- α) y metformina (Metf.).

Respuesta molecular: monocapas de células HUVECS hiperglucémicas (HG) fueron estimuladas durante 24 h con 100 μ mol/L de $MnCl_2$. Post-estimulación las células fueron homogenizadas y mediante Western blot se analizó la expresión y activación de proteínas vinculadas a proliferación y apoptosis.

Resultados

Se demuestra que el estímulo con 100 μ mol/L de $MnCl_2$ incrementa significativamente la tasa de proliferación (Figura 1, 2, 3), migración (Fig. 4) y formación de túbulos *in vitro* (Fig. 5), tanto en células endoteliales como fibroblastos HGs. Por otro lado, el análisis de homogenizados de HUVECS HGs mostró, aumento en los niveles de fosforilación de ERK 1/2; indicador de activación de vías mitogénicas, disminución de los niveles relativos de caspasa-3 clivada; ejecutor de muerte por apoptosis y disminución de los niveles de expresión relativa de Bax; un regulador *pro*-apoptótico (Fig. 6). Por último, se evidenció que cultivos de HF HGs y co-estimulados con 100 μ mol/L de $MnCl_2$ conservan un mayor número de células bipolares o multipolares y con morfología elongada, indicadores del estado de salud celular, en comparación con el grupo control y el grupo control no tratado con $MnCl_2$ (Fig. 7).

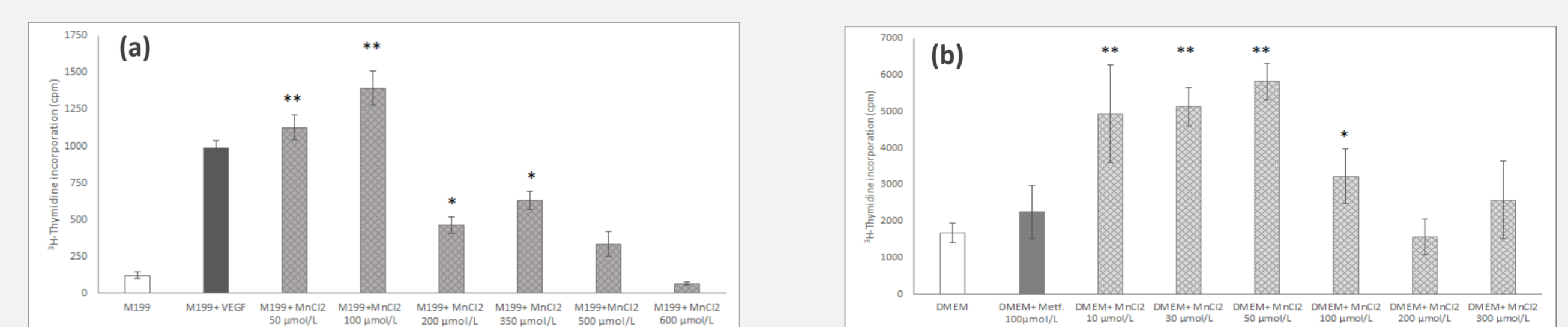


Figura 1: Respuesta proliferativa de las células (a) HUVECs y (b) fibroblastos normoglucémicos a las 48 h post-estimulación con diferentes concentraciones de $MnCl_2$ (prom \pm DS; * p <0.05, ** p <0.01 Vs M199, n=3).

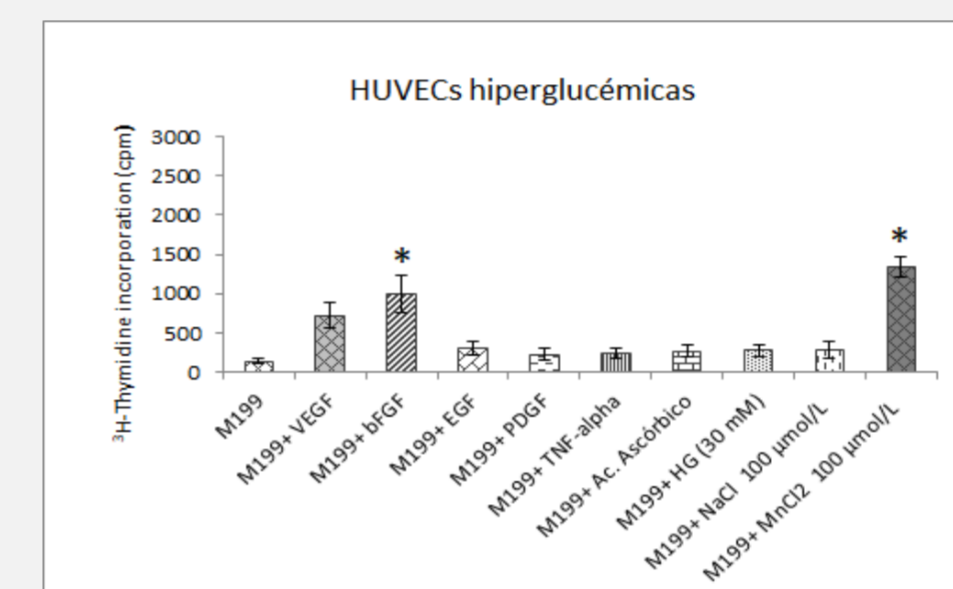


Figura 2: Respuesta proliferativa de HUVECS HGs a diferentes factores de crecimiento y citoquinas pro-angiogénicas a las 48 h post-estimulación (prom \pm DS; * p <0.05 Vs grupos de tratamientos, n=3).

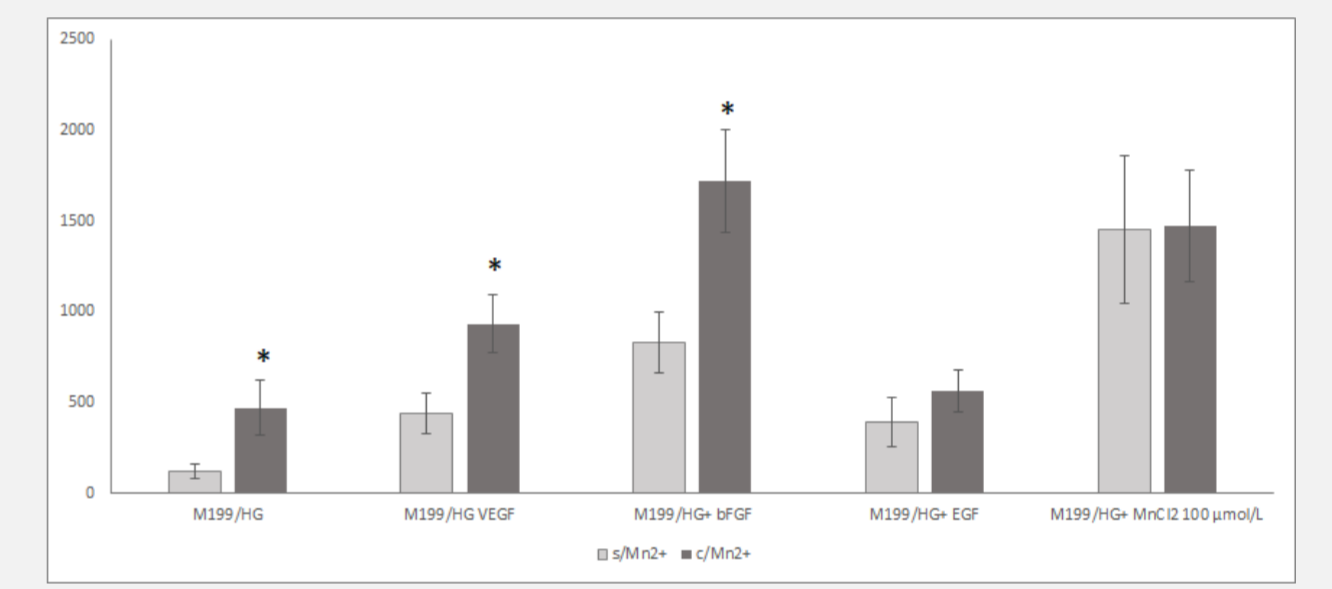


Figura 3: Respuesta proliferativa de HUVECS HGs pre-tratadas con Mn^{2+} a tres factores de crecimiento proangiogénicos (VEGF, bFGF o EGF). (prom \pm DS; * p <0.05) (s/ Mn^{2+} : HUVECS no-tratadas con Mn^{2+} , c/ Mn^{2+} : HUVECS pre-tratadas durante 48 h con Mn^{2+}).

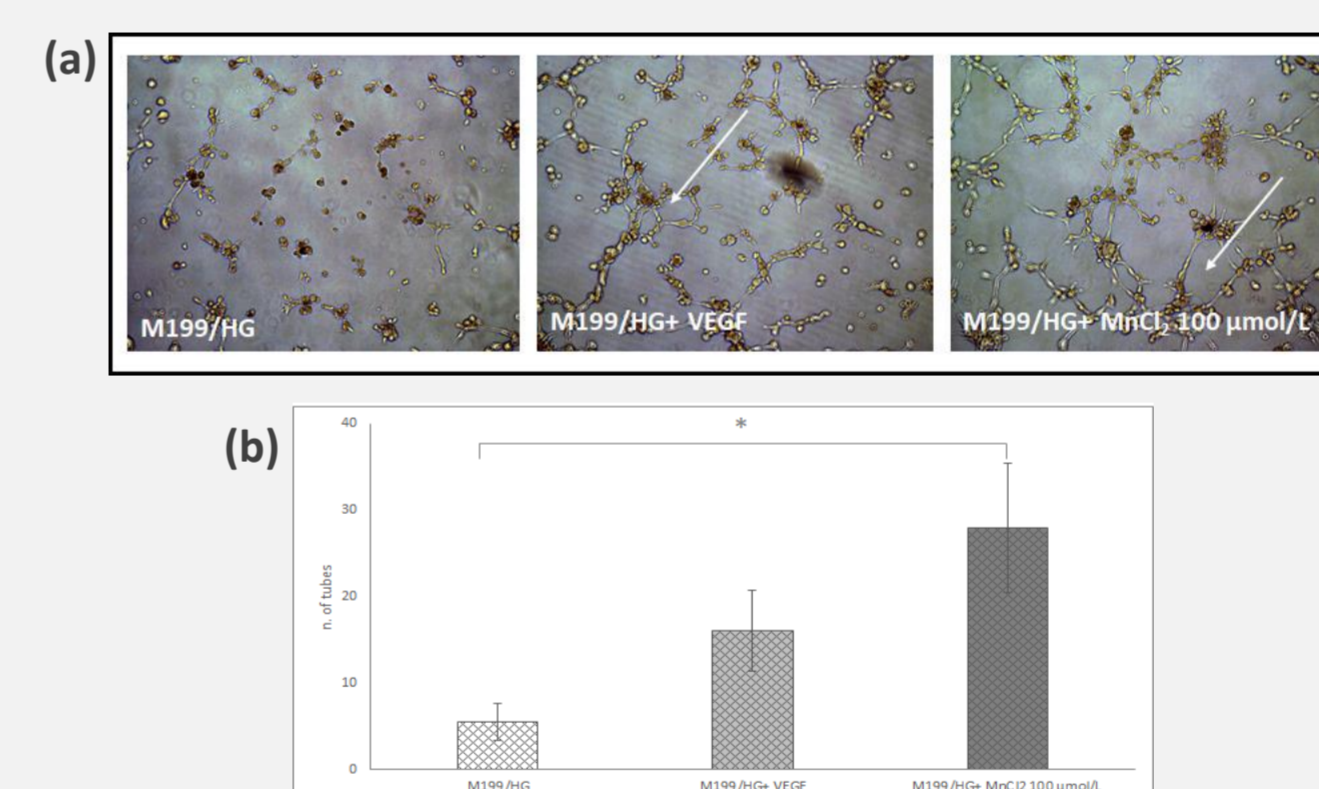


Figura 4: (a) Microfotografías que muestran túbulos formados sobre Geltrex™. Note la mayor densidad de túbulos para el estímulo con 100 μ mol/L de Mn^{2+} . Las flechas blancas señalan los túbulos observados. M.O: X100. (b) Las barras representan el número promedio de túbulos formados sobre la matriz a las 6 h post-estimulación. (prom \pm DS, * p <0.05, n=3).

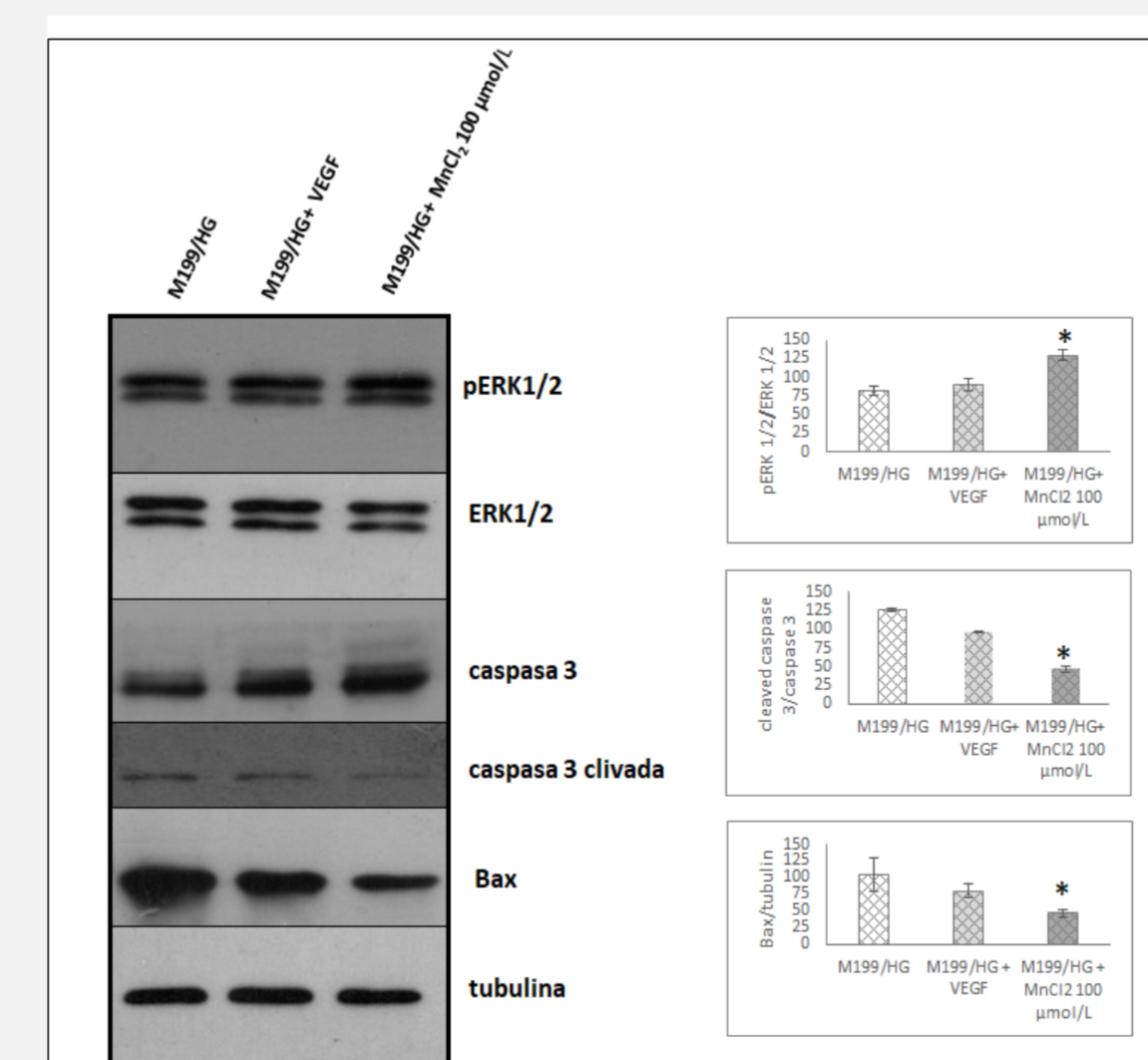


Figura 6: Western blot y densitometría de bandas para los niveles de fosforilación de ERK 1/2, los niveles relativos de caspasa 3 clivada y Bax en homogenizados de células endoteliales HGs, post-estimuladas durante 24 h con 100 μ mol/L de $MnCl_2$ (Prom \pm DS, * p <0.05, n=3).

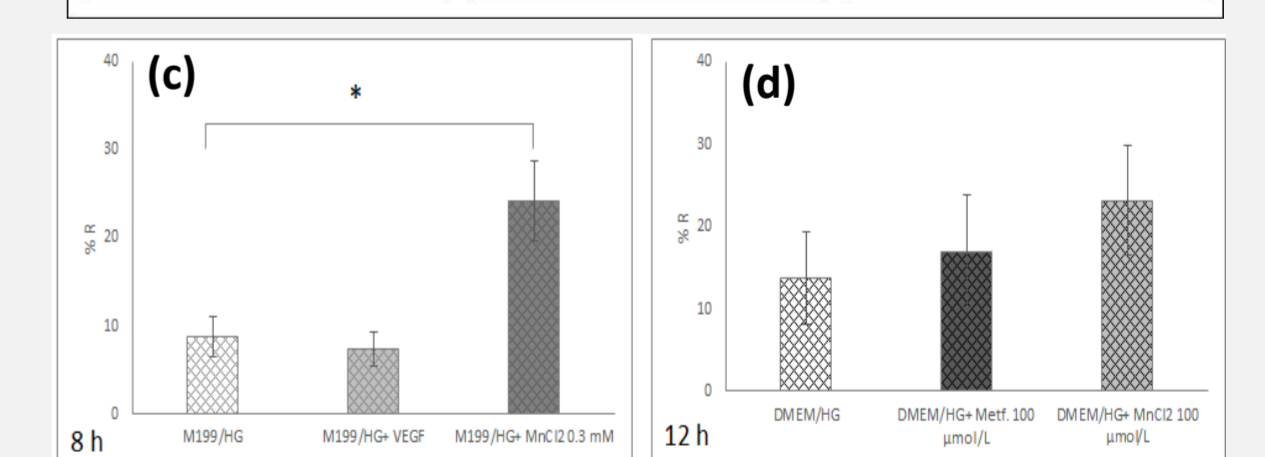
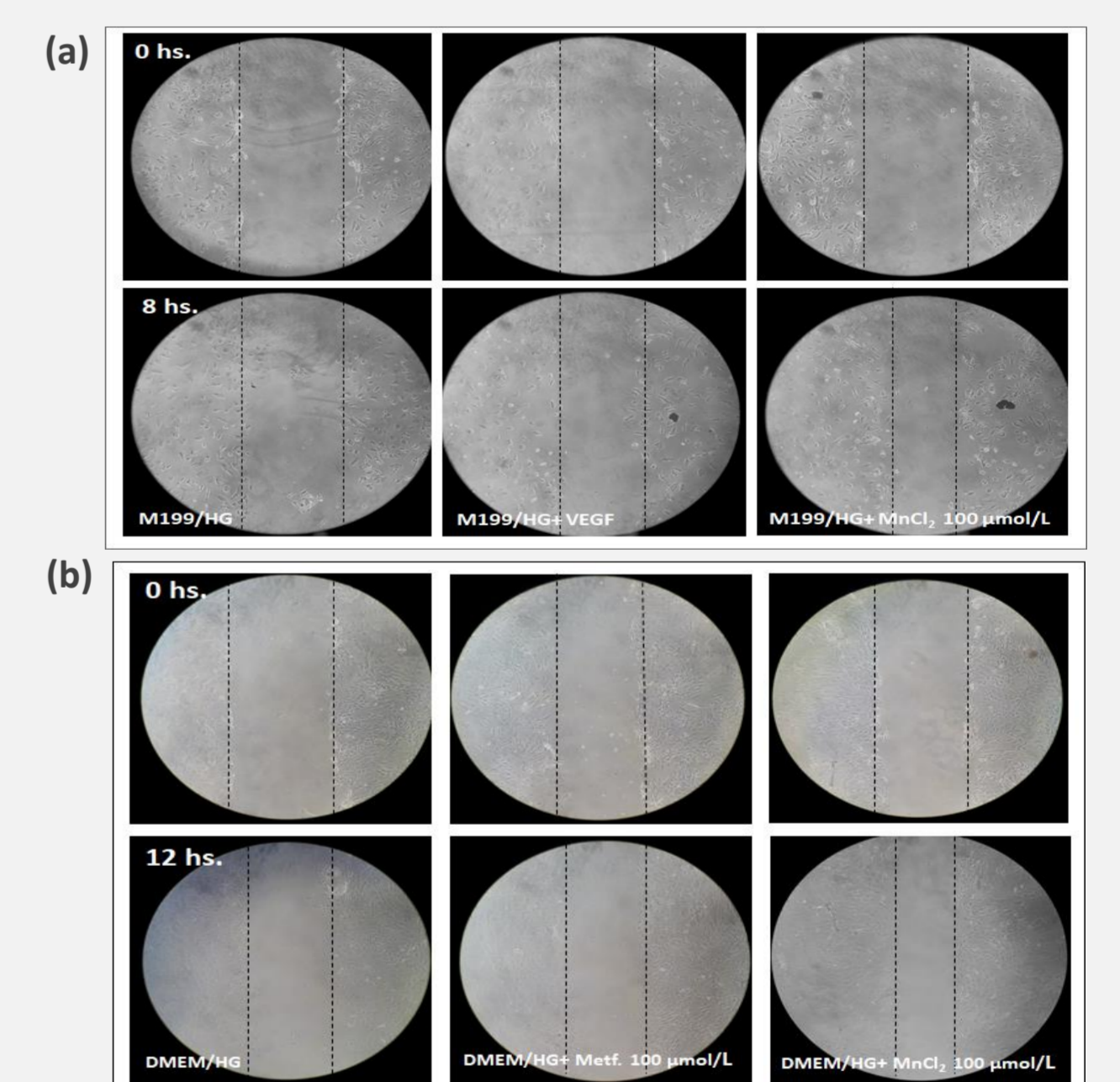


Figura 5: Microfotografías que muestran el área de la herida recubierta por células (a) HUVECS y (b) fibroblastos HGs a las 8 y 12 h post-estimulación respectivamente con 100 μ mol/L de $MnCl_2$. M.O: X100. Las barras representan el promedio del porcentaje de recubrimiento (%), de (c) HUVECS y (d) fibroblastos HGs a las 8 y 12 h post-estimulación. (Prom \pm DS, * p <0.05, n=3).

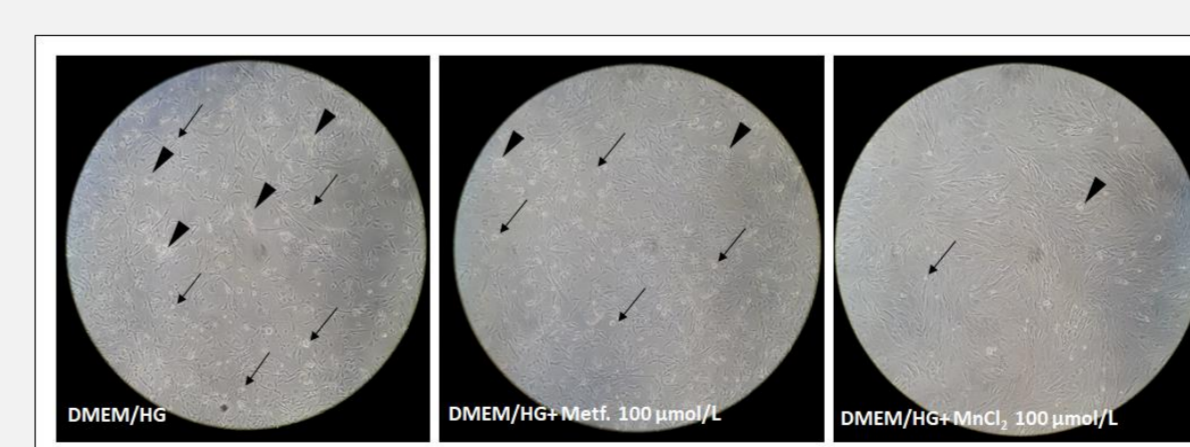


Figura 7: Microfotografías que muestran el aspecto de fibroblastos hiperglucémicos post-tratados con Mn^{2+} durante 48 h. Nótese la menor densidad de células adheridas a la superficie de los pocillos y una mayor densidad de células desprendidas (puntas de flecha) y restos celulares (flechas) en los grupos controles en comparación con el grupo tratado con $MnCl_2$. M.O 100X

Conclusiones: el Mn^{2+} tendría potencial reparativo ya que modularía positivamente la respuesta de las células endoteliales y fibroblastos hiperglucémicos y podría ser considerado como una alternativa terapéutica económica y promisoría para restaurar la integridad tisular en heridas potencialmente crónicas de pacientes diabéticos.