



# Endocrinología, Diabetes y Nutrición



## P-044 - DIABETES PREGESTACIONAL Y PROGRAMACIÓN INTRAUTERINA: ESTUDIO FUNCIONAL *IN VITRO* DE MICROARN ASOCIADO CON DIABETES MATERNA

M.C. Valverde Tercedor<sup>a</sup>, J.Á. Guillén Salgado<sup>a</sup>, S. Muñoz Descalzo<sup>a</sup>, M. Valcárcel Herrera<sup>a</sup>, J. Lilao Garzón<sup>a</sup>, L. Hernández Baraza<sup>a</sup> y A.M. Wügener<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (iUIBS), Las Palmas de Gran Canaria. <sup>b</sup>Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria.

### Resumen

**Introducción:** La diabetes mellitus (DM) materna se asocia a largo plazo con un aumento del riesgo de diabetes y obesidad en la descendencia. El concepto "programación intrauterina" de las enfermedades crónicas no transmisibles sostiene que el ambiente prenatal tiene gran relevancia en el desarrollo de la descendencia. Estos efectos podrían ser mediados por modificaciones epigenéticas como los miARNs.

**Objetivos:** Estudio funcional de los miARNs 125b-5p, 19a-3p, 20a-5p encontrados en un trabajo previo en muestras de placenta de mujeres con diabetes y que mejor discriminan el grupo de madres con diabetes tipo 1 (DM1) de los grupos controles.

**Materiales y métodos:** Las células trofoblásticas HTR-8/SVneo, en monocapa o en cultivo 3D mediante la formación de esferoides, se cultivan durante 4 días en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se ensayan tres condiciones diferentes: condiciones fisiológicas (5,5 mM de glucosa), condiciones DM1 (25 mM de glucosa) y condiciones DM2 (25 mM de glucosa y 100  $\mu$ M de palmitato). En cuanto a los esferoides, se analizó su formación en tiempo real en las tres condiciones de estudio mediante el IncucyteSX5. En cuanto al cultivo en monocapa, se realiza la lisis celular y posterior extracción del ARN total mediante TRI REAGENT (MRC Inc., EE.UU.). Se mide la calidad y la concentración del ARN mediante NanoDrop ND-1000 y se realiza la síntesis de ADNc (TaqMan<sup>®</sup> Advanced miRNA Synthesis). El análisis del nivel de expresión de los diferentes miARNs se realiza mediante RT-PCR utilizando sondas Taqman (7500 Fast real time PCR system Agilent), empleando miARN 191-5p y miARN 103-3p como controles endógenos. Se realizan 3 réplicas por cada condición y 3 réplicas biológicas de los cultivos en momentos distintos de tiempo. El estudio de expresión de los microRNAs se realiza mediante cuantificación relativa. Para cada miRNA se calculó el  $\Delta$ Ct (Ct estudio-Ct control),  $\Delta\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct de estudio- $\Delta$ Ct control) y la cuantificación relativa ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Posteriormente se realiza el análisis estadístico mediante SPSS.

**Resultados:** RQ miARN 19a-3p (control = 1), (DM1 = 0,51) y (DM2 = 0,89); RQ miARN 125b-5p (control = 1), (DM1 = 1,39) y (DM2 = 1,15); RQ miARN 20a-5p (control = 1), (DM1 = 1,57) y (DM2 = 1,61). Se observa (mediante Incucyte) un área de mayor tamaño de los esferoides crecidos en condiciones de DM2 (28,326  $\mu$ m<sup>2</sup>) y un área de menor tamaño en condiciones de DM1 (18,235  $\mu$ m<sup>2</sup>) respecto al control (22,708  $\mu$ m<sup>2</sup>) a las 96 horas del comienzo del experimento.

**Conclusiones:** El experimento realizado hasta ahora sugiere un efecto de la glucosa sobre la expresión de los miARN seleccionados. Están en marcha las réplicas biológicas, el análisis de miARN en los esferoides y los análisis estadísticos para sacar conclusiones más definitivas.