



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

VARIACIONES EN LA SÍNTESIS DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS (ROS) Y  
ÓXIDO NÍTRICO (ON), EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE RECIÉN NACIDOS  
SANOS CON HISTORIA FAMILIAR DE DIABETES MELLITUS TIPO 2.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**HIPÓLITO NOE ALVARADO VÁSQUEZ.**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**  
**DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013.**



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de octubre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ALVARADO VÁSQUEZ HIPOLITO NOÉ** con número de cuenta **81139747** con la tesis titulada **“VARIACIÓN EN LA SÍNTESIS DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS (ROS) Y OXÍDO NÍTRICO (ON), EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE RECIEN NACIDOS SANOS CON HISTORIA FAMILIAR DE DIABETES MELLITUS TIPO 2”**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA**:

Presidente: **DRA. MARTHA TORRES ROJAS**  
Vocal: **DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**  
Secretario: **DR. EDGAR ZENTENO GALINDO**  
Suplente: **DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**  
Suplente: **DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**  
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de enero de 2013

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM  
POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SEGUIR CRECIENDO  
ACADÉMICAMENTE.**

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA POR LA  
BECA No. 169862 QUE ME OTORGÓ.**

**A LOS MIEMBROS DE MI COMITÉ TUTOR:  
DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
DR. EDGAR ZENTENO GALINDO**

**POR SU TIEMPO Y COMENTARIOS DURANTE LA REALIZACIÓN  
DE ESTE PROYECTO**

## **AGRADECIMIENTOS**

A LOS MIEMBROS DE MI JURADO POR SU TIEMPO Y PACIENCIA PARA REVISAR ESTE ESCRITO:

**DRA. MARTHA TORRES ROJAS**

**DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**

**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO**

**DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ**

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A MI TUTOR EL DR. MONTAÑO, ESPERO QUE TODOS LOS ENOJOS QUE LE HICE PASAR PUEDA OLVIDARLOS.

AL DR. FELIPE MASSO Y A LA M. EN C. ARACELI PAEZ POR COMPARTIR CONMIGO SUS CONOCIMIENTOS.

A LA M. EN B.E. ESTRELLA ZAPATA, POR TODAS ESAS DIVERTIDAS Y ENTRETENIDAS PLATICAS ACERCA DE TODO, Y DE NADA AL MISMO TIEMPO.

AL DR. EDGAR ZENTENO, GRACIAS POR TODO.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA: REBECA, ELVIRA Y EMMA.

EN ESPECIAL AL DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA POR TOMARSE SIEMPRE TIEMPO PARA PLATICAR CONMIGO.

## DEDICATORIAS

A SARA POR ESTAR AHÍ.

A MIS "CHAPARROS" DIEGO Y NAOMI QUE SON Y  
SERÁN MI MOTOR POR SIEMPRE.

A MAMÁ POR NO PERDER NUNCA SU FÉ EN MI  
A PAPÁ

A LA "BANDA": ANA, ELI, RAFA, MANOLO, IRMA,  
JESÚS Y EL RICKI

Y TAMBIEN A LA BANDA "MEDIO GRANDE": ARELI, CARLANGAS,  
BRUNO, ARI, OLI, MICKI, ITZEL, SHARENI;  
Y A LA BANDA "CHIQUITA": SANTI Y JÍME

AL DR. ADOLFO POR SU CONTINUO Y ESPECIAL APOYO

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA.**

**“Como científico, sabes que cada nuevo descubrimiento que tengas la suerte de desvelar, dará lugar a más preguntas de las que tenías cuando iniciaste la investigación, y que siempre debes cuestionar si lo que pensaste era correcto y recordarte lo poco que sabes. La ciencia es una continua lección de humildad”.**

**Michael Duff**

**Universidad de Michigan.**

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
- Agradecimientos .....	4
- Dedicatorias .....	7
- Resumen .....	12
- Abstract .....	14
-Capítulo I. Introducción .....	15
1.1 DIABETES MELLITUS .....	15
1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA DM2 .....	20
1.3 LA CÉLULA ENDOTELIAL .....	23
-Capítulo II. Hipótesis y Objetivos .....	27
-Capítulo III. Resultados. Características generales de las mujeres embarazadas .....	28
3.1 Análisis por citometría de flujo .....	29
- Capítulo IV. Artículo: HUVECs from newborns with a strong family history of diabetes show diminished ROS synthesis in the presence of high glucose concentrations. Diabetes Metab Res Rev 2007; 23:71-80. ..	30
- Capítulo V. Artículo: Reduced NO synthesis and eNOS mRNA expression in endothelial cells from newborns with a strong family history of type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2007; 23:559-66. ....	43
- Capítulo VI. Discusión .....	54
- Capítulo VII. Conclusiones .....	63
- Capítulo VIII. Perspectivas .....	64
- Capítulo IX. Referencias. ....	65
- Anexo A. Artículos y Congresos.....	76
- Anexo B. Cuestionario aplicado a las madres evaluadas .....	78

## Resumen

La variación continua en la concentración de la glucosa sanguínea, se asocia con daño endotelial temprano en los individuos con una historia familiar para la diabetes mellitus tipo 2 (HFDM2). En este estudio, se propuso que la célula endotelial (CE) de individuos clínicamente sanos con HFDM2, es más susceptible al estrés provocado por la hiperglucemia. Para determinar esto, se evaluó el efecto que concentraciones de glucosa  $>5\text{mM/L}$ , tuvieron sobre las CEs obtenidas de la vena del cordón umbilical (HUVECs) de 12 niños con HFDM2 (niños con al menos 3 familiares en primer grado con la enfermedad) y de 30 niños sin HFDM2, incubadas por 24 o 48 h con glucosa. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la proliferación celular del 50%, y de 90% en la actividad mitocondrial de las HUVECs de recién nacidos con HFDM2, en presencia de 15 o 30 mM/L de glucosa por 48 h. Asimismo, la concentración de los metabolitos del óxido nítrico (ON) en el medio de cultivo de las HUVECs de niños con HFDM2, tuvieron una clara disminución en su concentración ( $p<0.05$ ). Al determinar tamaño y granularidad por citometría de flujo, se identificó una población celular única en las HUVECs obtenidas de los niños con HFDM2, en comparación las HUVECs obtenidas de los niños sin HFDM2, mostraron dos poblaciones celulares. La determinación por citometría de flujo de las especies de oxígeno reactivas (ROS) y del ON, evidenció un porcentaje menor de células positivas para la síntesis de ROS y de ON en las HUVECs con HFDM2. En comparación, el porcentaje de HUVECs positivas para la síntesis de ROS y de ON en los niños control, mostró un aumento significativo ( $P<0.01$ ). La incubación con desacopladores mitocondriales (CCCP) o con inhibidores de la captura de glucosa (citocalasina B) inhibió la síntesis de ROS en ambas poblaciones de HUVEC. Nuestros resultados también mostraron una disminución en la expresión de los transcritos para eNOS y para p53, asociado con una mayor expresión de los transcritos para GLUT1, en HUVECs obtenidas de niños con HFDM2. Los resultados obtenidos de las HUVECs de los niños control mostraron un aumento en los transcritos para eNOS, sin cambios observables en la expresión para p53 o GLUT1. En conclusión, nuestros resultados sugieren una asociación entre la

HFDM2 con la síntesis alterada de ROS y de ON como consecuencia de anomalías en el metabolismo de la glucosa y deficiente actividad mitocondrial.

## **Abstract**

The continuous variation in serum glucose concentration is associated with a family history of type 2 diabetes mellitus (FHDM2); the latter is considered a risk factor to develop diabetes mellitus (DM) and/or endothelial dysfunction. In this study we propose that endothelial cells from healthy newborns with FHDM2 are more susceptible to the stress induced by hyperglycemia. We evaluated the effect of >5 Mm/L glucose concentrations on ROS and NO synthesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), obtained from twelve healthy newborns with FHDM2 (at least 3 first-degree family members with DM) and 30 without, incubated for 24 or 48 hrs with 15 or 30 mM/L glucose concentrations. Also, we assessed cell proliferation, mitochondrial activity and the expression of eNOS, GLUT1 and p53 transcripts. Our results showed a decrease of 50% in cell proliferation and a 90% reduction in mitochondrial activity in HFDM2 HUVECs incubated with either glucose concentration for 48 hrs. NO metabolites in the culture media of HFDM2 HUVECs were significantly diminished ( $p < 0.05$ ). Size and granularity determined by flow cytometry showed one cell population in HFDM2 HUVECs compared to two clearly defined populations in control HUVECs. Flow cytometry from HFDM2 HUVECs showed a minor percentage of cells synthesizing ROS and NO in the presence of high glucose concentrations, whereas control HUVECs showed a significant increase ( $p < 0.01$ ). The incubation of HUVECs with a mitochondrial uncoupler (CCCP) or an inhibitor of glucose uptake (cytochalasin B), inhibited the synthesis of ROS in both HUVECs. Our results also showed a diminished expression of eNOS and p53 transcripts and an enhanced expression of GLUT1 transcripts in HFDM2 HUVECs, in contrast control HUVECs showed an enhanced expression of eNOS but no modifications in GLUT1 or p53 transcripts. In conclusion, our results suggest an association between HFDM2 and a deficient synthesis of ROS and NO as a consequence of glucose metabolisms impairment and deficient mitochondrial activity.

## Capítulo I. Introducción

### 1.1- DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus (DM), es un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por la presencia de hiperglucemia, cuyo inicio se asocia con factores de origen genético, ambiental y nutricional. Sin embargo, las alteraciones en la acción o en la estructura de la hormona insulina se consideran como los puntos de inicio más importantes (1, 2). La elevación crónica en la concentración de glucosa, tiene como consecuencia el desarrollo de las alteraciones micro- y macrovasculares, así como el inicio de las complicaciones agudas (cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no-cetósico), y de las crónicas (retinopatía, nefropatía, etc.); características del paciente con DM no controlada (3-5).

Aunque la etiología de la enfermedad es muy variada, de manera general la enfermedad se divide en: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1, dependiente de insulina) y, Diabetes mellitus tipo 2 (DM2, no dependiente de insulina)

La Diabetes mellitus tipo 1.- Se origina en el 90% de los casos, por la destrucción de las células beta del páncreas por procesos autoinmunes, mientras que en un 10% su origen es idiopático (6,7). La DM1 se presenta fundamentalmente en niños y adolescentes, y tiene una mayor incidencia en el grupo entre los 10 a los 14 años de edad, sin embargo, se llega a diagnosticar ocasionalmente en adultos (8). En este tipo de diabetes la insulina circulante está virtualmente ausente, el glucagon del plasma está elevado (9), y las células  $\beta$  del páncreas son incapaces de responder ante los estímulos insulinogénicos. Por todo esto, la administración

de insulina exógena es necesaria para revertir el estado catabólico, inhibir la cetosis, disminuir la hiperglucagonemia, así como la concentración de glucosa circulante (10,11).

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).- Es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por grados variables de resistencia a la insulina, y la cual esta considerada dentro de las 10 principales causas de muerte en México (12,13). Esta forma de diabetes identificada por la presencia de resistencia a la insulina (1,14), tiene como efecto un aumento en la concentración sanguínea de la hormona (15). Aunque la DM2 es más común en adultos, se le está diagnosticando cada vez más a edades más tempranas (16,17). Actualmente, se desconoce el origen de este tipo de diabetes, ya que en contraste a lo observado en la DM-1, no se observa destrucción de las células beta del páncreas (1), ni se ha encontrado alguna asociación clara con agentes infecciosos como virus o bacterias tal y como se ha descrito en la DM-1. Por otra parte, aunque se han realizado numerosas investigaciones evaluando a diferentes genes ligados con el inicio de la enfermedad (18,19), las evidencias aún no son determinantes. El lento avance de la DM2, tiene como consecuencia su diagnóstico bastante tiempo después de originada, y en donde la única característica observada es una elevación gradual en la concentración de glucosa en sangre (20, 21).

A pesar de que la DM2 presenta un cuadro clínico menos agresivo en comparación con la DM-1, este tipo de enfermos presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones micro- y macrovasculares (22, 23). Ya que aún en concentraciones fisiológicas de insulina en el plasma, la concentración de glucosa

circulante está por encima de la concentración normal (24, 25). Algunos datos adicionales relevantes de la DM2, es el aumento en el riesgo de presentar la enfermedad asociado con el envejecimiento, la obesidad, así como con la escasa o nula actividad física (13,26). Asimismo, el riesgo de desarrollar DM2 es mayor en mujeres que fueron diagnosticadas con diabetes gestacional durante su embarazo, así como en individuos que presentan hipertensión o dislipidemias (27, 28). Algunos estudios epidemiológicos, han propuesto la importancia del aspecto genético en el inicio y evolución de la DM2, sin embargo, los patrones de herencia son complejos y están aún muy mal definidos (29). Para hacer más complicada la probabilidad de poder entender a la DM2, existen variantes adicionales como la diabetes tipo 2 de inicio temprano (Early-Onset type 2 Diabetes). De acuerdo con autores como García-García y cols. (30-69), esta debería considerarse como un subtipo de la enfermedad, ya que es un padecimiento más agresivo, el cual requiere un tratamiento con insulina más temprano y sufre de complicaciones más severas que el paciente con diabetes común (31-70). Evidencias obtenidas al evaluar enfermos del país, indican que la mayoría de los pacientes son delgados con un promedio de edad de 28 años, pero ya con requerimientos de insulina. Es relevante mencionar que en el 73% de los casos, estos pacientes confirmaron la presencia de familiares en primer grado con DM2 (30-69).

Desde hace tiempo se considera como de gran importancia al patrón genético en la DM2. Numerosas evidencias muestran la presencia de la enfermedad en grupos étnicos específicos (32), en gemelos monocigóticos (33), así como la existencia de una agregación familiar (34). Sin embargo, se continúa investigando la manera en que se hereda, así como el número de genes involucrados con el

inicio de la enfermedad. En la población mexicana, la diabetes mellitus tipo 2 se presenta como una enfermedad heterogénea y multifactorial en donde la compleja interacción entre factores genéticos y ambientales, hace que hasta el presente sea sumamente difícil definir al gen o genes implicados en el inicio del padecimiento (35); razón por la que se considera a la DM2 como una enfermedad poligénica (36).

Entre los genes que se han asociado con la susceptibilidad a la enfermedad se ha identificado a los siguientes:

- a) El gen de la insulina.- Se han encontrado mutaciones en el gen de la insulina que afectan la estructura primaria de las cadenas A y B de la insulina, lo cual disminuye sus efectos biológicos (37). También se han descrito mutaciones que afectan el procesamiento de la proinsulina, lo que provoca una alta concentración de la hormona en circulación; la cual sin embargo, tiene un efecto mínimo en la regulación de la concentración de glucosa (38).
- b) Transportadores de glucosa (GLUTs).- Se han estudiado los genes de los transportadores de glucosa 1 (GLUT1) y 4 (GLUT4), y aunque se han encontrado alteraciones en ambos (39, 40), su importancia está aún por determinarse.
- c) Gen de la glucocinasa (MODY 2).- La glucocinasa se considera como el modulador de la célula beta ante las variaciones en la concentración de glucosa, ya que realiza el primer paso en el metabolismo de ésta. Sin embargo, aunque se han encontrado alteraciones en este gen en pacientes con diabetes del tipo MODY (maturity onset diabetes of the young, de aquí las siglas MODY) (41, 42), éstas son muy raras o están ausentes en la forma común de la enfermedad.

d) Otros genes evaluados son el del factor de transcripción NF4 $\alpha$  (MODY 1), así como el factor de transcripción HNF1 $\alpha$  (MODY 3). Sin embargo, la importancia real de MODY 1 aún no es clara (43); mientras que para MODY 3 se ha observado su asociación solo en un 25% de los casos de DM2 (44).

e) Genes mitocondriales.- La fosforilación oxidativa está involucrada en la producción de energía, así como en la señalización inicial para la secreción de insulina estimulada por la glucosa, en el páncreas. Algunos trabajos recientes, señalan la presencia de una mutación puntual en la posición 3243 del gen del ARNt-Leu en pacientes con DM2 (45), lo que afecta la secreción de insulina. Sin embargo, esto se ha visto solo en un 2% de los pacientes con diabetes (46, 47).

f) Gen del receptor del glucagon.- En algunos pacientes con DM2, la concentración de esta hormona se encuentra elevada o muestra un cambio mutación en la posición Gly40Ser de su receptor, motivo por el cual algunos autores la han asociado con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (48, 49).

g) El gen de la glucógeno sintasa.- Aunque en poblaciones finlandesas se han encontrado dos alelos polimórficos, estos resultados no se han podido repetir en estudios realizados en población japonesa (50,51).

h) También se ha estudiado al gen de la hexocinasa IV, la cual interviene de manera importante en el metabolismo de la glucosa. Aunque se han identificado numerosas mutaciones en este y otros genes implicados en el metabolismo celular, aun no se ha demostrado su importancia para el inicio de la DM2 (52, 53).

i) Gen de la obesidad (*ob*). Identificado por primera vez en la cepa de ratón C57BL/6J *ob/ob*, estudios recientes demuestran su presencia en humanos con o

sin obesidad (54). Sin embargo, las evidencias encontradas, no han demostrado su importancia para el desarrollo de la DM2 en humanos (55, 56).

j) Gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).- Al estar asociado con el inicio de la resistencia a la insulina, el TNF- $\alpha$  es considerado como una de las principales citocinas involucradas en la evolución de la DM2 (57);sin embargo, también está presente en niños y adultos obesos sin diabetes (58,59).

Por las evidencias disponibles en la actualidad, la DM2 es una enfermedad con un origen poligénico, lo cual dificulta el poder determinar el origen de la enfermedad.

## 1.2.- EPIDEMIOLOGIA DE LA DM2.

Datos e información proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y por la Federación Internacional de Diabetes (IFD), indican que existen en el mundo alrededor de 346 millones de personas con diabetes, y que para el 2004 se calcularon 3.4 millones de fallecimientos asociados a la enfermedad (60). Información de la misma OMS, destaca que 80% de las muertes se registran en los países de ingresos bajos y medios, principalmente en menores de 70 años; con un 55% de fallecimientos en mujeres (60), y en donde la tendencia indica un incremento en el número de enfermos con diabetes en todo el mundo (61). Aumento que se asocia con: la edad de los individuos, la urbanización y los cambios en el estilo de vida (62).

En un análisis de tendencias sobre diabetes en mayores de 25 años de 199 países, realizada por Danaei G. y colaboradores de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard en 2008, se estimó que existían 285 millones de

personas con diabetes en el mundo, de los cuales un 90% del total eran diabéticos tipo 2 (63), y los cuales aumentaron a más del doble en las últimas décadas (63). El análisis de estos datos sugiere que la cantidad de enfermos aumentará hasta 439 millones para el año 2030; lo cual representará el 7.7% del total de la población adulta entre los 20 a los 79 años de edad (64). Es preocupante, por otro parte, que la DM2 que era relativamente rara hace algunas décadas en los países en desarrollo, ahora muestre tasas altas de la enfermedad en sus jóvenes o individuos de edad media (65). Actualmente, se considera que entre los 10 países con el mayor número de enfermos están China, India, Pakistán, Indonesia y Bangladesh (63-65).

En el caso de Norteamérica, se determinó que la prevalencia de la DM2 en adolescentes entre los 10-19 años de edad en el año 2001, era de 42/100 000 adolescentes (66), con una frecuencia mayor en edades entre los 15-19 años (67). Este aumento observado, se asoció con la presencia de prediabetes en los adolescentes. Definiendo prediabetes, como la hiperglicemia que no satisface los criterios diagnósticos para la diabetes mellitus. De acuerdo con el estudio NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), se detectó un incremento del 7% en 1999-2000, a 13.1% en el 2005-2006, en la prevalencia de intolerancia a la glucosa en ayuno en edades entre 12 y 19 años (68).

En México, la prevalencia de la DM2 de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) 2000, fue de 7.5% en los adultos de más de 20 años (69); con una prevalencia de 7.8% en mujeres y de 7.2% en hombres. En el mismo estudio se menciona la importancia de la edad, y la mayor prevalencia de la DM2 en las zonas urbanas (8.1%), en comparación con las rurales (6.5%) (69). Resultados

obtenidos por Villalpando y cols. (70), después de analizar los resultados de la ENSANUT 2006, mostraron que la prevalencia de la enfermedad se incrementó a 14.4%; la cual estuvo asociada con un mal control metabólico (definido esto, como un deficiente control de la concentración de la glucosa en sangre) en los pacientes con diabetes. Los autores encontraron que mientras un 5.3% tenía un buen control, un 38.4% tenían un mal control y un 56.2% del total de los enfermos tenía un muy mal control de su enfermedad. En la ENSANUT 2012, de los 6.4 millones de adultos mexicanos que han recibido diagnóstico por un médico y reciben tratamiento, sólo 25% presentó evidencia de un control metabólico adecuado (107). Dichos datos varían si se considera a la diabetes tipo 2 de inicio temprano. Como ya se mencionó está es más agresiva, y presenta las complicaciones agudas y crónicas del paciente con DM2 de manera temprana (30); razón por la cual es necesario el tratamiento anticipado con insulina (31,72).

A pesar de la gran variabilidad de las poblaciones evaluadas, estas tienen en común la presencia de alteraciones en la secreción y en el efecto de la insulina (71). En México, un factor de riesgo adicional que se ha determinado para el inicio de la DM2 es la presencia de obesidad o de sobrepeso, características que se han encontrado en el 30.8% de los adultos enfermos y con edades entre los 20 a los 69 años de edad (73).

Otra característica importante relacionada con la resistencia a la insulina presente en el paciente con DM2 (75), es la síntesis alterada de proteínas estructurales de la mitocondria en las células musculares (74), y en otros tejidos que se ven afectados en la DM2 (músculo cardíaco, cerebro, hígado, y endotelio) (75, 76, 77,78). Es importante recordar que las concentraciones elevadas de glucosa, por

sí solas, son capaces de iniciar el daño en los tejidos mencionados, pero en especial en el sistema circulatorio; asociándose esto con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (11, 13, 22, 23). En este contexto, el principal tipo celular afectado es la célula endotelial, la cual es susceptible al daño derivado de la hiperglucemia crónica (76).

### 1.3.- LA CÉLULA ENDOTELIAL.

Las células endoteliales (CEs) intervienen en el control del tono vasomotor, circulación de las células sanguíneas, control de la hemostasis, permeabilidad e intervienen en la inmunidad innata adaptativa (79,80). Las CEs presentan una gran diversidad de formas (81), y muestran un patrón de alineamiento en la dirección del flujo sanguíneo, el cual puede modificarse en condiciones de estrés hemodinámico (82). La gran variabilidad en la forma de las CEs, se ha encontrado en aorta de rata, en donde están orientadas en la dirección del flujo sanguíneo; en contraste CEs aisladas de la arteria pulmonar presentan una forma triangular siendo más anchas y cortas (30 x 14  $\mu\text{m}$ ) (83). En este mismo modelo experimental realizado en ratas, las CEs aisladas de la vena pulmonar fueron grandes y de forma redonda, mientras que las células de la vena cava inferior fueron largas, estrechas y rectangulares (83). Esta gran variabilidad en forma y tamaño de la CE, se considera que esta en relación con la función que la célula endotelial este llevando a cabo. Como ejemplo de lo anterior, se ha sugerido que la aterosclerosis es resultado de una combinación entre variaciones en el flujo vascular con algunos factores de riesgo asociados (concentración de lípidos, por ejemplo) (84). Asimismo, se ha observado que la CE tienen la capacidad de variar

su morfología, en donde se incluye la formación de pseudópodos citoplasmáticos dentro del lumen capilar, los cuales pueden influir significativamente en la resistencia hemodinámica al flujo vascular (85).

El endotelio es una estructura semipermeable, lo cual le permite regular el transporte de fluidos y solutos dentro y fuera de la sangre (86). Para realizar esto, las células endoteliales poseen dos vías: la transcelular y la paracelular. En la transcelular participan vesículas cubiertas de clatrina, cuerpos multivesiculares y lisosomas, los cuales representan a los componentes de la vía endocítica (87). En la paracelular se controla la estabilidad de las uniones intercelulares. Las CEs participan activamente en la transcitosis, fenómeno que interviene en la transferencia de moléculas a través de la CE, y el cual es mediado por unas estructuras especializadas conocidas como caveolas (87). Adicional a esto, las células endoteliales son tan importantes para la funcionalidad vascular y orgánica, que se les considera actualmente como un órgano (88). Las CEs intervienen en la angiogenesis, en la regulación de la permeabilidad vascular, en el tráfico de los leucocitos y en la hemostasis (79-82). Esta diversidad de funciones la llevan a cabo por las numerosas moléculas que son capaces de sintetizar y de liberar al medio; de las cuales, se presentan las siguientes:

A) Prostaciclina.- Es el principal producto de la ciclooxigenasa la cual se forma en las células endoteliales, así como en la media y en la adventicia (son dos capas estructurales adicionales que involucran fibroblastos o proteínas como la elastina, o el colágeno que envuelven al endotelio), en respuesta al estrés, hipoxia y por inductores de la síntesis del óxido nítrico (ON) (89). Dicha respuesta induce la relajación del músculo liso vascular actuando en conjunto con el ON (89).

B) Factor hiperpolarizante endotelio-dependiente (EDHF).- En estudios realizados en arterias de diversos organismo se ha demostrado que la acetilcolina y otros dilatadores dependientes del endotelio causan la hiperpolarización y relajación derivadas del EDHF (89, 90). Para su liberación, y de manera similar al ON requiere de un aumento en la concentración de calcio (89, 90).

C) Factores vasopresores derivados del endotelio (EDCF).- El endotelio es capaz de liberar sustancias con capacidad vasoconstrictora, como: anión superóxido, endoperóxidos, tromboxano A2 y endotelina-1 (91, 92).

D) Óxido nítrico (ON).- Este es un gas altamente reactivo, producido por casi todos los tipos celulares en el organismo, el cual juega un papel de gran importancia en procesos tan diversos como la modulación del tono vascular, la neurotransmisión, así como en la regulación de las células del sistema inmune y la citotoxicidad mediada por células (93, 94). El ON es sintetizado por una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS), que están presentes en tres tipos: NOS tipo 1 o neuronal (nNOS); NOS tipo 2 o inducible (iNOS) y NOS tipo 3 o endotelial (eNOS) (95). Estas son oxido-reductasas que contienen flavoproteínas que convierten al aminoácido arginina y al oxígeno molecular en citrulina y óxido nítrico (95). Este mediador es muy relevante para el endotelio, debido a que interviene regulando la proliferación y la muerte de la célula endotelial (96), y la modulación de los procesos vasculares y trombóticos, en los cuales interviene este tipo celular (97). Cabe destacar que la elevación en la concentración de la glucosa sanguínea puede afectar la síntesis del ON por la célula endotelial. Si bien la información a este respecto sigue siendo contradictoria, las evidencias disponibles muestran que la síntesis del ON frente a una exposición aguda a la

glucosa induce su síntesis; en tanto que la exposición crónica a este carbohidrato lleva a la inhibición de su síntesis (98), iniciando en consecuencia el daño vascular que se encuentra frecuentemente en el paciente diabético.

Por los antecedentes presentados, el estudio de la actividad endotelial previo al desarrollo de la enfermedad clínica en individuos con HFDM2, es de gran importancia por las diferentes funciones que cumple la célula endotelial a nivel vascular y orgánico (99, 100). El conocimiento generado permitirá prevenir y tratar de manera anticipada el daño vascular derivado de la disfunción endotelial temprana en estos individuos. Aquí cabe destacar que disfunción endotelial es un término que se refiere al balance negativo de las sustancias bioactivas que se producen y se liberan en el endotelio a causa o como consecuencia de la pérdida de su integridad celular. En consecuencia, este trabajo se enfocó en la evaluación de la síntesis así como en la asociación existente entre el endotelio-ROS-ON, en HUVECs obtenidas de recién nacidos sanos con una fuerte historia familiar de la enfermedad (definida esta, como la presencia de 3 o más familiares en primera línea con DM2). Asimismo, se evaluó la síntesis de los transcritos primarios para la eNOS y de dos elementos asociados con la síntesis del ON, el GLUT1 así como p53.

## **Capítulo II.**

### **Hipótesis**

“La disfunción endotelial temprana observada en las células endoteliales (HUVECs) de recién nacidos sanos, pero con una fuerte historia familiar de diabetes mellitus tipo 2, es consecuencia de una síntesis reducida de las especies de oxígeno reactivas, así como del óxido nítrico, dos de los mediadores más importantes para la funcionalidad y viabilidad de la célula endotelial”.

### **Objetivo general**

1.- Determinar la variación en la síntesis de las especies de oxígeno reactivas (ROS) y del óxido nítrico (ON) en HUVECs de recién nacidos sanos con y sin historia familiar de DM2 (HFDM2).

### **Objetivos Particulares:**

1.- Aislar y mantener en cultivo HUVECs obtenidas de cordón umbilical de recién nacidos sanos con y sin HFDM2.

2.- Evaluar la viabilidad y la actividad mitocondrial en HUVECs de recién nacidos con y sin HFDM2

3.- Determinar mediante citometría de flujo la síntesis de ROS y de ON en células endoteliales incubadas en presencia de concentraciones suprafisiológicas de glucosa (> 5mM/L) por 24 y 48 h.

4.- Determinar la concentración de metabolitos del ON en el medio de cultivo de las células incubadas por 24 y 48 h en concentraciones suprafisiológicas de glucosa.

5.- Realizar la extracción del ARNm y evaluar la expresión de la eNOS, del factor de transcripción p53 (asociado con la expresión del gen de GLUT1), así como del transportador de glucosa GLUT1.

### Capítulo III. Resultados.

Los métodos utilizados se describen en las copias de los sobretiros. Los resultados encontrados en este trabajo se presentan en capítulos, y en la parte final se muestra una breve discusión con las probables perspectivas derivadas del mismo.

Las características generales de las madres de los niños con HFDM2 se muestran a continuación.

Se encontró que ninguna de las madres presentó diabetes gestacional. Las madres con HFDM2 presentaron un mayor peso, así como un mayor índice de masa corporal (IMC).

**TABLA 1**  
**Características generales de las mujeres embarazadas.**

	Con HFDM2	Control	P
<i>n</i>	12	30	
Edad (años)	21.8 ± 3.6	22.8 ± 1.4	N.S.
Peso (kg)	83.9 ± 7.0	65.1 ± 1.9	0.003
Altura (m)	1.55 ± 0.28	1.58 ± 0.6	N.S.
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	34.8 ± 4.9	25.2 ± 1.0	0.02
[rango IMC]	[30 - 47]	[24 - 27]	
Glucosa en ayuno (mM/L)	4.8 ± 0.3	4.5 ± 0.2	N.S.
[rango mM/L]	[4.1 - 5.5]	[4.1 - 4.7]	
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.6 ± 0.5	5.3 ± 0.4	N.S.
Embarazos	1 - 2	1 - 2	
Nacimientos	1 - 2	1 - 2	

### 3.1 Análisis por citometría de flujo

La evaluación inicial, usando citometría de flujo, reveló diferencias claras de tamaño (FSC-H) y granularidad (SSC-H) en las HUVECs obtenidas de niños con y sin HFDM2, tal y como se ve en la Figura 1. El análisis usando citometría de flujo reveló lo que podemos considerar como una sola población de HUVECs en las células endoteliales obtenidas de los recién nacidos sanos con HFDM2 (A); en contraste, dos poblaciones diferentes fueron observadas en las HUVECs obtenidas de los recién nacidos sanos sin HFDM2 (B). Estas características se mantuvieron de manera general en todas las células endoteliales evaluadas (n=12 en HUVECs de niños con HFDM2; y n=30 en HUVECS de niños sin HFDM2). Estos datos permitieron suponer la existencia de diferencias asociadas con la funcionalidad de las células endoteliales, de acuerdo a su origen.

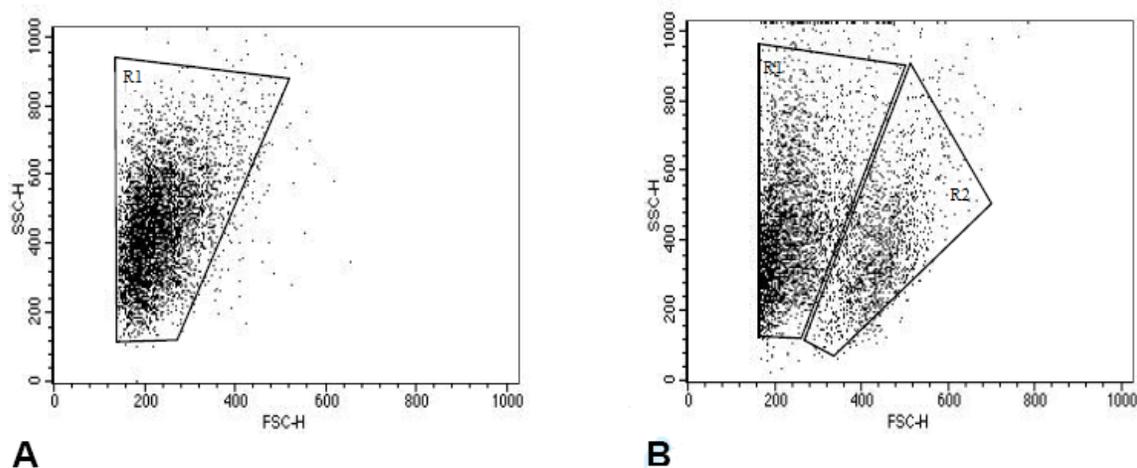


Figura 1.- Dot-plots de HUVECs obtenidas de recién nacidos sanos con HFDM2 (A) y de recién nacidos sanos sin HFDM2 (B). El porcentaje de HUVECs encontrado en la región R1 fue de más del 90% en la figura A. Mientras que en la figura B, el porcentaje de HUVECs fue de 60% en la región 1 y del 40% aproximadamente en la región 2. Se muestra una figura representativa.

**Capítulo IV. Artículo: Alvarado-Vásquez N, et al. HUVECs from newborns with a strong family history of diabetes show diminished ROS synthesis in the presence of high glucose concentrations. Diabetes Metab Res Rev 2007; 23:71-80.**

### **Introducción**

Se ha observado una alterada función endotelial temprana en individuos con historia familiar de diabetes mellitus tipo 2 (HFDM2), lo cual se ha asociado con el desarrollo de la enfermedad en la vida adulta. Esta alteración en la funcionalidad endotelial, se ha relacionado con el estrés oxidativo crónico en que se encuentra el paciente diabético. Lo anterior, se basa en el incremento observado en diferentes marcadores de estrés oxidativo y en el aumento en la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) por células mononucleares obtenidas de pacientes con diabetes. Se ha descrito que las células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVECs) de recién nacidos con madres diabéticas tipo 1 son menos resistentes al estrés por alteraciones del flujo sanguíneo, presentan menos capacidad de captura de glucosa, así como alteraciones a nivel de la membrana plasmática y en sus mitocondrias. Sin embargo, y a pesar de lo anterior, aún se desconoce si la HFDM2 aumenta la susceptibilidad de la célula endotelial a las concentraciones suprafisiológicas de glucosa. Por esta razón, en este trabajo se decidió evaluar el papel del metabolismo de la glucosa, así como el papel de la mitocondria en la generación de ROS, en HUVECs obtenidas de recién nacidos sanos pero con una HFDM2.

### **Resultados**

Se encontró que las HUVECs con HFDM2 incubadas por 24 o 48 h con 15 o 30 mM/L de glucosa mostraron una disminución de un 50% en la proliferación celular. Por otro lado, se encontró que la incubación con 15 o 30 mM/L de glucosa tuvo como efecto una disminución de un 20-25% en la actividad mitocondrial a las 24 h. Sin embargo, los resultados obtenidos a las 48 h, revelaron una drástica disminución del 90% en su actividad mitocondrial. La incubación con un desacoplante mitocondrial (CCCP) o un inhibidor del transporte de glucosa (citocalasina B) disminuyó la síntesis de ROS principalmente en las HUVECs de niños con HFDM2. La incubación con un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (DPI) no reveló una inhibición significativa en la generación de ROS en las HUVECs, esto independientemente de su origen.

## **Discusión**

La HFDM2 es reconocida como un factor de riesgo para el inicio de la disfunción endotelial. Se ha descrito una función vascular alterada en recién nacidos sanos con madres diabéticas tipo 1 y 2, en donde las alteraciones encontradas incluyen la disfunción endotelial como consecuencia de procesos inflamatorios de bajo grado, así como alteraciones de la estructura mitocondrial. En estos individuos el proceso inflamatorio se ha asociado con el aumento en la generación de ROS por las NAD(P)H oxidasas vasculares, o bien por la mitocondria. Sin embargo, nuestros resultados revelaron que la inhibición de la NAD(P)H oxidasa por su inhibidor (DPI) no tuvo mayor efecto en la generación de ROS. Sin embargo, la utilización de un inhibidor del transporte de glucosa (citocalasina B) tuvo como efecto una drástica disminución en la generación de ROS en las HUVECs de niños con HFDM2, en contraste con lo observado en las HUVECs de los niños sin

HFDM2. Resultados similares se observaron al incubar las HUVECs de recién nacidos con HFDM2 con el desacoplante mitocondrial CCCP. En conclusión, nuestros resultados sugieren que las HUVECs con HFDM2 presentan una deficiente síntesis de ROS, consecuencia de una deficiente respuesta de la mitocondria de la célula endotelial ante el estrés derivado de la concentración suprafisiológica de glucosa.

# HUVECs from newborns with a strong family history of diabetes show diminished ROS synthesis in the presence of high glucose concentrations

Noé Alvarado-Vásquez<sup>1</sup>  
Araceli Páez<sup>2</sup>  
Estrella Zapata<sup>2</sup>  
Susana Alcázar-Leyva<sup>3</sup>  
Edgar Zenteno<sup>4</sup>  
Felipe Massó<sup>2</sup>  
Luis F. Montañó<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica,  
Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias, 14080, México

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular,  
Instituto Nacional de Cardiología  
'Ignacio Chávez', 14080, México

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones  
Científicas Hans-Selye, A.C., 76000,  
Querétaro, Qro., México

<sup>4</sup>Laboratorio de Inmunología,  
Departamento de Bioquímica,  
Facultad de Medicina UNAM, 04510,  
México

\*Correspondence to:  
Luis F. Montañó, Laboratorio de  
Inmunología, Departamento de  
Bioquímica, Facultad de Medicina  
UNAM, A.P. 70-159, C.P. 04510,  
México. E-mail:  
lfmontmx@yahoo.com



Received: 8 February 2006  
Revised: 11 May 2006  
Accepted: 24 May 2006

## Abstract

**Background** A family history of type 2 diabetes mellitus (DM) increases the probability to develop DM and endothelial dysfunction. The probable mechanism involves augmented reactive oxygen species (ROS) synthesis. The aim of this study was to evaluate the synthesis of ROS in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) obtained from healthy newborns with (experimental) and without (control) a strong family history of type 2 DM, exposed to different glucose concentrations.

**Methods** HUVECs were exposed to various glucose concentrations for 24 and 48 h periods, before cell proliferation, mitochondrial activity, and mitochondrial membrane potential were determined. Intracellular ROS synthesis in the presence or absence of the mitochondrial uncoupler CCCP, cytochalasin B, or diphenyleneiodonium (DPI) was also evaluated.

**Results** As opposed to control HUVECs, we found that experimental HUVECs exposed to 30 mmol/L glucose showed a 50% decrease in cell proliferation, a 90% reduction in mitochondrial activity, and a statistically significant inhibition of ROS synthesis in the presence of CCCP or cytochalasin B; DPI had no effect.

**Conclusions** Our results suggest that mitochondria and NAD(P)H-oxidase from HUVECs obtained from healthy newborns with a family history of DM have an innate deficient response to high glucose concentrations. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** endothelium; glucose; type 2 diabetes mellitus; superoxide; reactive oxygen species; oxidative stress

## Introduction

A family history of type 2 diabetes mellitus (DM) is associated with an impaired vascular function in healthy offspring and adult individuals, and with the development of DM in the adult life [1–4]. The development of macro- and microvascular disease in DM is the result of continuous oxidative stress on endothelial cells [5,6]. Enhanced serum markers of oxidative stress have been demonstrated in diabetic patients [7]. Also, an increase in reactive oxygen species (ROS) synthesis has been shown in mononuclear cells isolated from type 2 diabetic patients stimulated with phorbol myristate acetate [8] and in young people with type 1 DM [9,10]. Sank *et al.* [11], and Cester *et al.* [12], have shown that human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) isolated from newborns with type 1 diabetic mothers were 20–40% less resistant to shear stress, took up glucose more slowly, showed alterations

in the plasma membrane, and had a more active fluid phase endocytosis and an increase in mitochondrial area, compared to control HUVECs. An increase in L-arginine transport and nitric oxide synthesis as well as an impairment in the action of insulin due to hyperglycaemia has been shown in HUVECs isolated from newborns to women with gestational diabetes [13,14]. Although we have shown the relevance of family history on endothelial susceptibility, and probably in the development of vascular damage [15], it is still unknown whether familial diabetic background augments the susceptibility of the endothelial cells to high glucose concentrations.

Since the origin of ROS in endothelial cells stimulated with supraphysiological glucose concentrations has been related to NAD(P)H-oxidase, and mitochondrial activity [16,17], and recent findings suggest that superoxide generation in the mitochondria is the first step in a vicious cycle of oxidative stress in DM [18,19], we decided to evaluate (1) the role of glucose metabolism and (2) the mitochondrial involvement in ROS synthesis. To this purpose we performed experiments in the presence or not of a mitochondrial uncoupler, an inhibitor of NAD(P)H-oxidase, and a glucose transport inhibitor, in an endothelial susceptibility model.

## Materials and methods

### Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Umbilical cords were obtained from six newborn offspring of young non-diabetic women (18–26-year-old) with a strong family history of type 2 DM (three or more first degree relatives with the disease) (experimental HUVECs) or from 10 pregnant women (20–25 years-old) without a family history of type 2 diabetes (control HUVECs). None of the mothers in either groups had gestational diabetes at the time of delivery (Table 1). All patients signed a written informed consent.

HUVECs were isolated from each individual cord using type II collagenase (0.2 mg/mL, GIBCO/BRL). Non-pooled cells were cultured in T-75 tissue culture flasks (NUNC) in M-199 medium, whose original formula contains 5 mmol/L glucose, supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 37.5 µg/mL of endothelial cell growth factor (ROCHE), at 37 °C in a humid atmosphere containing 7% CO<sub>2</sub> [15]. In some experiments the M-199 medium was complemented with additional glucose in order to reach a final glucose concentration of 15 or 30 mmol/L. Cells were used within passages 4–10 and were identified as endothelial by their morphology and by uniform positive endoglin (CD105) surface antigen (BD Pharmigen) staining.

Table 1. Characteristics of the Mexican mestizo pregnant women

	Diabetic background	Control	<i>p</i>
<i>n</i>	6	10	
Age (years)	22.8 ± 3.0	22.3 ± 1.4	N.S.
Weight (kg)	84.9 ± 7.0	64.1 ± 1.9	0.003
Height (m)	1.55 ± 0.06	1.58 ± 0.03	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	35.3 ± 4.9	25.6 ± 1.0	0.02
Range BMI (kg/m <sup>2</sup> )	(30–47)	(24–27)	
Fasting glucose (mmol/L)	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	N.S.
(Range mmol/L)	(4.1–5.5)	(4.1–4.7)	
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.5 ± 0.5	5.1 ± 0.4	N.S.
Pregnancies	1–2	1–2	
Births	1–2	1–2	
<i>Characteristics of the newborn infants</i>			
<i>n</i>	6	10	
Weight (kg)	3.15 ± 0.4	3.1 ± 0.23	
(Range kg)	(2.350–3.550)	(2.800–3.600)	
Height (m)	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.01	

Data represent the mean ± S.D. N.S., not statistically significant.

### Cell proliferation and mitochondrial activity

HUVECs ( $5 \times 10^3$  cells) were cultured for 24 h in 96-multiwell tissue culture plates with non-glucose supplemented M-199 culture medium. After this time, the culture medium was discarded and 100 µL of fresh 15 or 30 mmol/L glucose-complemented medium (without phenol red) was added to the cultures for a further 24 or 48 h. Plates were washed with Phosphate buffer saline (PBS) (PBS: 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O, 0.01 M NaHPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7.2) and stained with 100 µL from 0.1% crystal violet solution (w/v) (Sigma) in 70% ethanol for 20 min, the plates were washed with deionized water, and air-dried. The bound dye was dissolved with 100 µL of a 10% acetic acid. Optical density was measured at 595 nm in a 96-multiwell-plate spectrophotometer (BIO-TEK Instruments, Inc. Highland Park, Winooski, VT, USA). Crystal violet stain allows the evaluation of cell viability as well as cellular proliferation in relation to the culture time [20,21].

Mitochondrial dehydrogenase activity was determined by the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL) in sterile PBS [22]. HUVECs incubated 24 or 48 h with medium alone or supplemented with either 15 or 30 mmol/L of glucose were loaded with 20 µL of PBS-MTT for the last 4 h of the culture period. The MTT reduced end-product, formazan, was dissolved with 100 µL of 0.04 N-HCl in isopropyl alcohol, and the absorbance was recorded at 570 nm. In some experiments glucose transport was blocked with cytochalasin B (50 ng/mL Sigma) simultaneously with MTT load for the last 4 h of culture time.

### Reactive oxygen species (ROS) determination

Intracellular ROS formation was determined using the fluorescent probe dichlorofluorescein diacetate bis(acetoxy-methyl) (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR,

USA). Endothelial cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were seeded in 6-multiwell tissue culture plates for 24 h. Culture medium was discarded and fresh 15 or 30 mmol/L glucose-supplemented culture medium (without phenol red) was added. The cultures were incubated for a further 24 or 48 h period. At the end, the cell cultures were treated with trypsin solution (0.05% trypsin/1 mmol EDTA), centrifuged at 153g for 6 min, resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.8 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  0.81 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.44 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.33 mmol/L, and glucose 5.5 mmol/L) and loaded with DCFH-DA  $10 \mu\text{M}$  for 15 min [23]. ROS synthesis by HUVECs ( $1 \times 10^4$  cells) was analysed by flow cytometry (Becton Dickinson FacsCalibur instrument, San Jose, CA, USA). Positive controls consisted of HUVECs incubated with  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Similar experiments were performed in the presence of the mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, 50 nM, Molecular Probes), the glucose transport inhibitor cytochalasin B or the NAD(P)H-oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI,  $10 \mu\text{M}$ , Sigma).

### Mitochondrial membrane potential

HUVECs ( $2 \times 10^5$  cells) were cultured on a 6-multiwell tissue culture plate with 15 or 30 mmol/L glucose-supplemented M-199 medium for 24 or 48 h; and in the end the cells were resuspended in 1 mL of HBSS, and loaded for 15 min with 50 nmol of 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide ( $\text{DiOC}_6$  (3)) (Molecular Probes), in order to determine mitochondrial membrane potential by flow cytometry in  $1 \times 10^4$  cells [24].

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS v 11 software. Variance analysis, followed by Dunnett's test, was used. Results were shown as mean  $\pm$  S.D. Statistical significance was considered as  $p < 0.05$ .

## Results

### Cell proliferation

Experimental HUVECs incubated with 15 or 30 mmol of glucose for 24 or 48 h showed a 40–50% decrease in cell proliferation ( $n = 6$ ; Figure 1(A)). Contrary to experimental HUVECs, control cells showed a slight and non-statistically significant increase in cell proliferation after 24 h of culture time, which reached a 80 or 50% increase with 15 or 30 mmol/L glucose, respectively, after 48 h ( $n = 10$ ; Figure 1(B)) ( $*p < 0.05$ ). We observed a spontaneous cluster formation in all the experimental endothelial cells (Figure 1(C)), exposed to 15 and 30 mmol/L glucose, in contrast to control HUVECs, which

showed a more homogeneous distribution (Figure 1(D)) and no cluster formation.

### Mitochondrial activity

A slight decrease (20–25%) of MTT reduction was observed in experimental HUVECs after 24 h of incubation with 15 or 30 mmol glucose; interestingly, there was a 90% inhibition in MTT reduction after 48 h of culture with 15 or 30 mmol glucose ( $n = 6$ ; Figure 2(A)). Control HUVECs ( $n = 10$ ) cultured with supraphysiological glucose concentrations, showed a 90–100% increase in mitochondrial activity after 48 h of culture time (Figure 2(B)) ( $*p < 0.05$ ).

The excess of glucose in the diabetic state stimulates the mitochondrial activity, which in turn increases the synthesis of ROS [25]. Additionally, our results showed that formazan precipitate, which reflects mitochondrial activity, in our experimental or control endothelial cells incubated with culture medium alone was uniformly distributed around the cell nucleus, in accordance with the cellular distribution reported for endothelial cell mitochondria (data not shown) [26]. Mitochondrial activity evaluated by MTT reduction, in the presence of an inhibitor of glucose transport (cytochalasin B, 50 ng/mL), showed a 95% inhibition in the deposit of formazan precipitates in experimental and control HUVECs (data not shown). This effect was independent of the glucose concentration, time of incubation, or origin of HUVECs.

### ROS determination

Figure 3(A) shows the ROS synthesis in negative (HUVECs without DCFH-DA) and positive controls (HUVECs incubated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and DCFH-DA). Figure 3(B) shows the percentage of experimental HUVECs synthesizing ROS, incubated with the culture medium non-supplemented with glucose or supplemented with 15 or 30 mmol/L glucose; the percentage of ROS+ cells was not modified after 24 or 48 h of culture time. We observed that a mean of 98% of ROS+ cells ( $n = 6$ ) were in the M1 region; a reduced percentage of ROS+ cells was found in the M2 region (<1%). An increase in the glucose concentration did not modify the percentage of ROS+ cells in either region (Figure 3(B)). In contrast, control HUVECs ( $n = 10$ ) showed a bimodal response after incubation with the culture medium alone (M1 =  $40.1 \pm 5.0\%$ , M2 =  $50.7 \pm 6.0\%$ ) (Figure 3(B)), but when the cells were exposed to 15 or 30 mmol/L glucose the percentage of cells in the M1 region diminished to  $26.9 \pm 3.0\%$ , and  $30.9 \pm 4.0\%$ , respectively, while the percentage of cells in the M2 region increased to  $68.3 \pm 5.0\%$ , and  $62.8 \pm 7.0\%$ , respectively (Figure 3(C)).

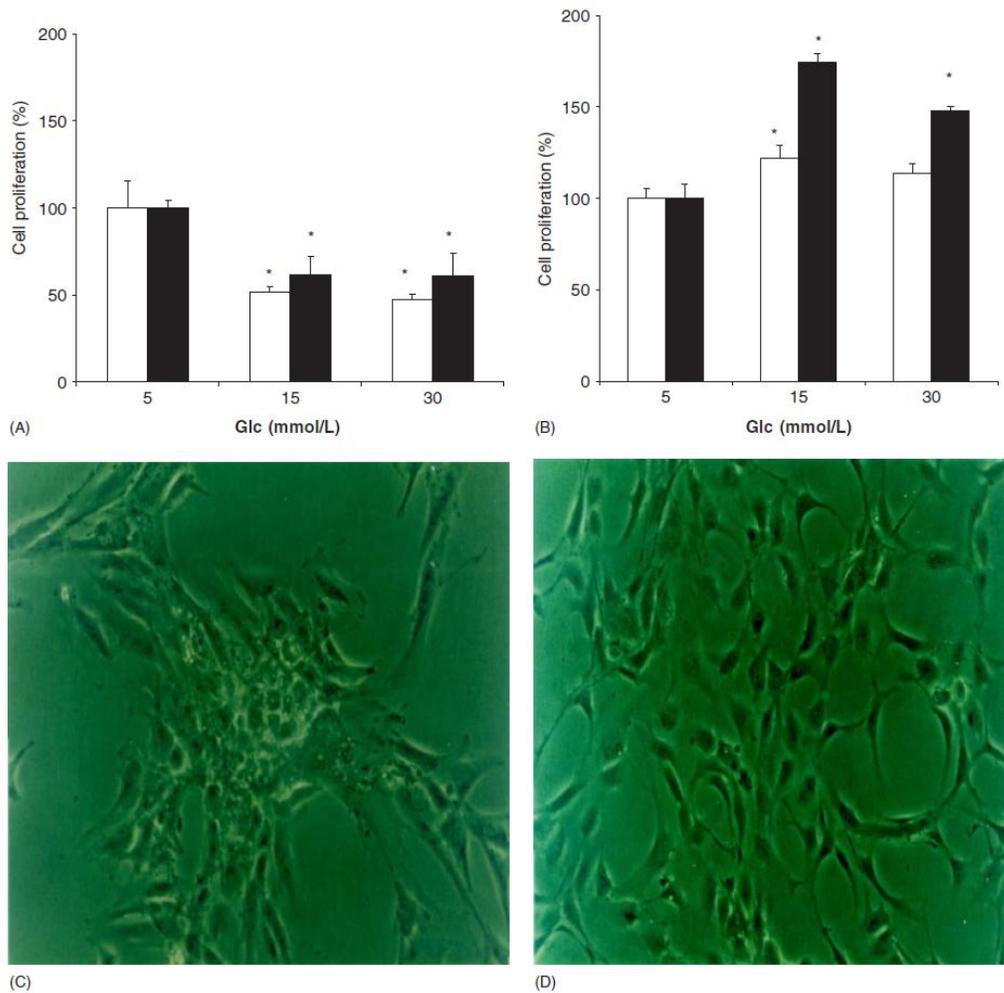


Figure 1. Cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) incubated with 5, 15 or 30 mmol/L of glucose for 24 (□) or 48 (■) h. (A) experimental and (B) control, HUVECs. (C) and (D) show the morphology of experimental and control HUVECs, respectively. Spontaneous cluster formation was observed in experimental HUVECs (C) with 15 or 30 mmol/L of glucose concentration. \* $p < 0.05$  was considered statistically significant versus control cells

### ROS synthesis in the presence of CCCP uncoupler

ROS synthesis in experimental HUVECs exposed to either glucose concentration was drastically reduced in the presence of the uncoupler (Figure 4(A)). Control HUVECs lost the bimodal pattern of ROS+ cells which we have shown in Figure 3(C), but maintained ROS synthesis, suggesting that ROS synthesis became homogeneous in all the control endothelial cells (Figure 4(B)). The synthesis of ROS in control HUVECs incubated with the uncoupler was not influenced by glucose concentration, although a minimum shift to the left was observed with 30 mmol glucose concentration (data not shown).

### ROS synthesis in the presence of cytochalasin B or DPI

Cytochalasin B inhibited the synthesis of ROS in experimental HUVECs and this inhibition was not modified by glucose concentration. The mean percentage of ROS+ cells in the six experimental HUVECs which was  $7.7 \pm 1.0\%$  in the M1 region of HUVECs exposed to non-glucose supplemented M-199 medium, diminished to  $4.1 \pm 1.5$  and  $4.2 \pm 1.0\%$  in cultures exposed to 15 or 30 mmol/L glucose concentrations, respectively. The percentage of ROS+ cells in the M2 region was not modified (Figure 5(A)). The bimodal response previously observed in control HUVECs was modified. The results obtained in control HUVECs ( $n = 10$ ) showed an increase in the mean

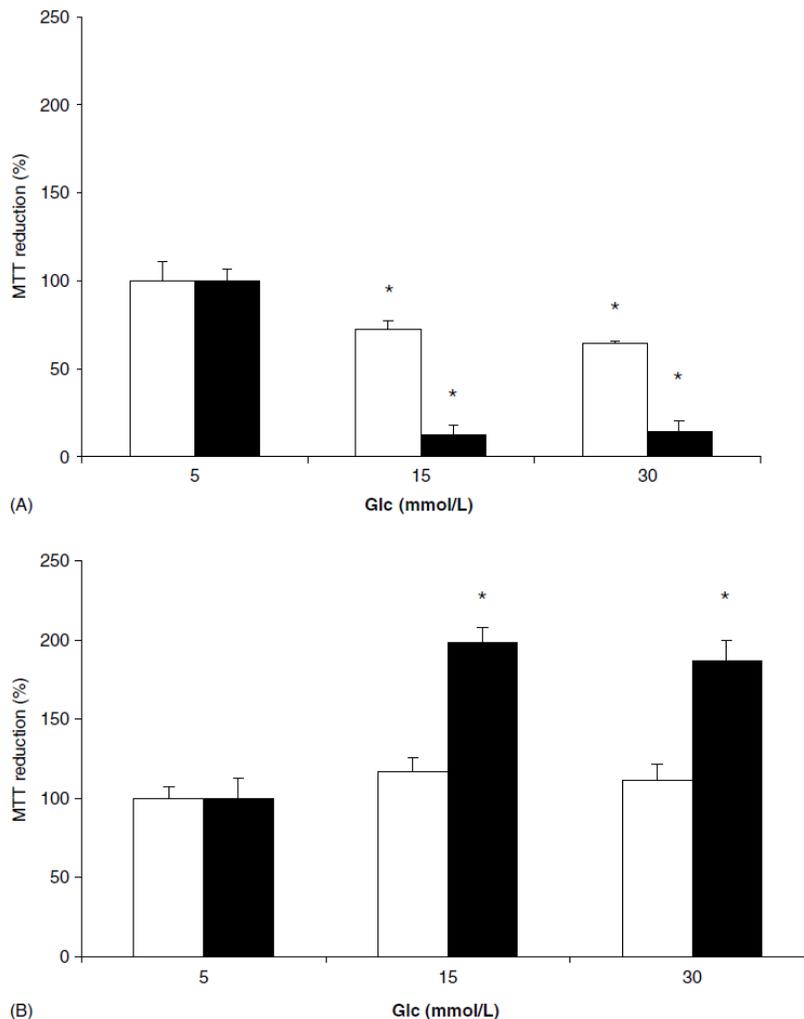


Figure 2. Mitochondrial activity determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction. HUVECs were incubated with 5, 15 or 30 mmol/L of glucose for 24 (□) or 48 (■) h. (A) Experimental, and (B) control, HUVECs. \* $p < 0.05$  was considered statistically significant

percentage of cells in the M1 region and a reduction in the percentage of cells in the M2 region, independently of the glucose concentration (non-glucose supplemented, M1 =  $88.1 \pm 7.0\%$ , M2 =  $10.1 \pm 2.0\%$ ; 15 mmol/L, M1 =  $69.2 \pm 6.0\%$ , M2 =  $29.3 \pm 4.0\%$ ; 30 mmol/L, M1 =  $69.1 \pm 4.0\%$ , M2 =  $28.9 \pm 3.0\%$ ) (Figure 5(B)).

The presence of DPI, an inhibitor of the NAD(P)H-oxidase, had a minor effect upon ROS synthesis in experimental HUVECs, independently of the glucose concentration (Figure 5(C)); these results were very similar to those obtained in the absence of DPI. In contrast, control HUVECs (Figure 5(D)) showed an increase in the mean percentage of cells in the M1 region, which was associated with a decrease in the mean percentage of cells in the M2 region, independently of the glucose

concentration (non-glucose supplemented medium, M1 =  $63.5 \pm 4.0\%$ , M2 =  $34.9 \pm 5.0\%$ ; 15 mmol, M1 =  $70.0 \pm 6.0\%$ , M2 =  $28.5 \pm 3.0\%$ ; 30 mmol, M1 =  $65.6 \pm 6.0\%$ , M2 =  $32.9 \pm 3.0\%$ ).

### Determination of mitochondrial membrane potential

Although some papers have shown that the loss of the mitochondrial membrane potential in endothelial cells incubated with high glucose is associated with apoptosis [27], we could not find significant changes in mitochondrial membrane potential under all the different experimental conditions that we used for both the experimental and control HUVECs (data not shown).

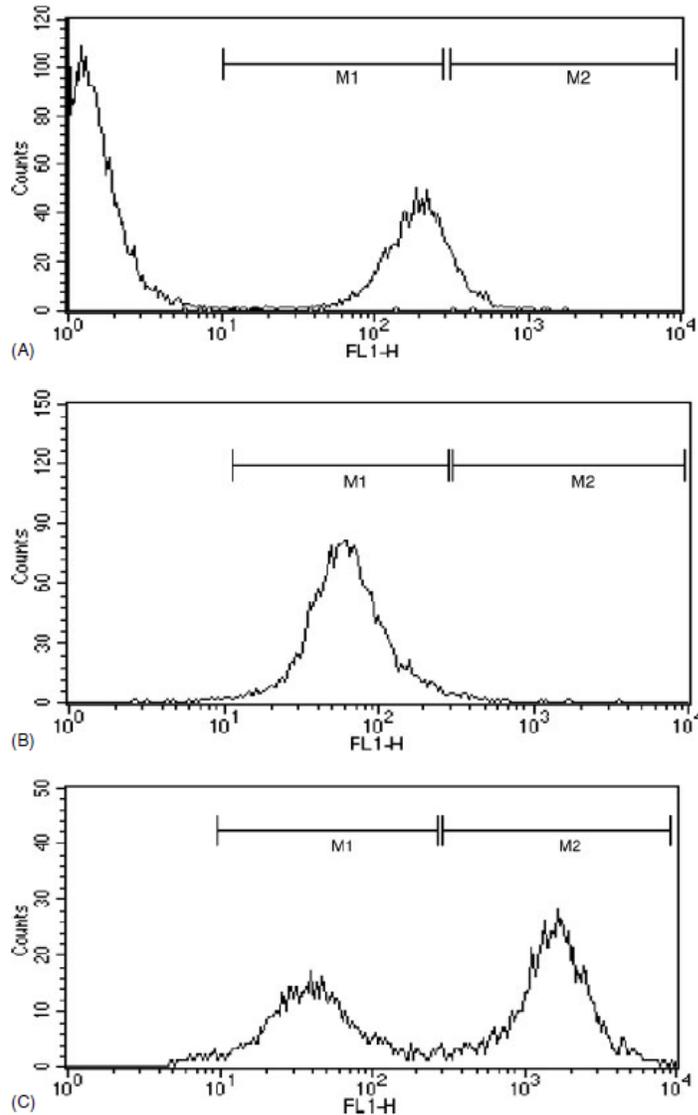


Figure 3. Reactive oxygen species (ROS) synthesis detected by DCFH-DA ( $10 \mu\text{M}$ ). Experimental controls are shown in Figure (A) which illustrates HUVECs without and with DCFH-DA and  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Experimental cells (B) showed a single cell population (M1 region) that produced ROS versus two cell populations (M1 and M2 regions) in control HUVECs (C). Although ROS synthesis was uniform in experimental HUVECs, in control HUVECs, there was a decrease in the percentage of ROS+ cells in the M1 region and an increase in the M2 region as the glucose concentration increased. The figure shows the results of a 48 h representative experiment

## Discussion

A family history of type 2 DM has been recognized as an important risk factor for vascular dysfunction [18,28,29]. Impaired vascular function in healthy offspring of mothers with type 2 DM, has also been described [2,3]. The vascular abnormalities in DM range from endothelial dysfunction to low-grade or sub-clinical inflammation [30].

ROS which stimulate endothelial cell proliferation [31,32] are synthesized by the mitochondrial respiratory chain and vascular NAD(P)H-oxidases, among others [31], and depend on glucose uptake and metabolism [33]. We found an inhibition in cell proliferation and repressed ROS synthesis in experimental HUVECs exposed to high glucose concentrations. The actual status of the mitochondria in experimental HUVECs is unknown, but it has been shown that the defective energy homeostasis

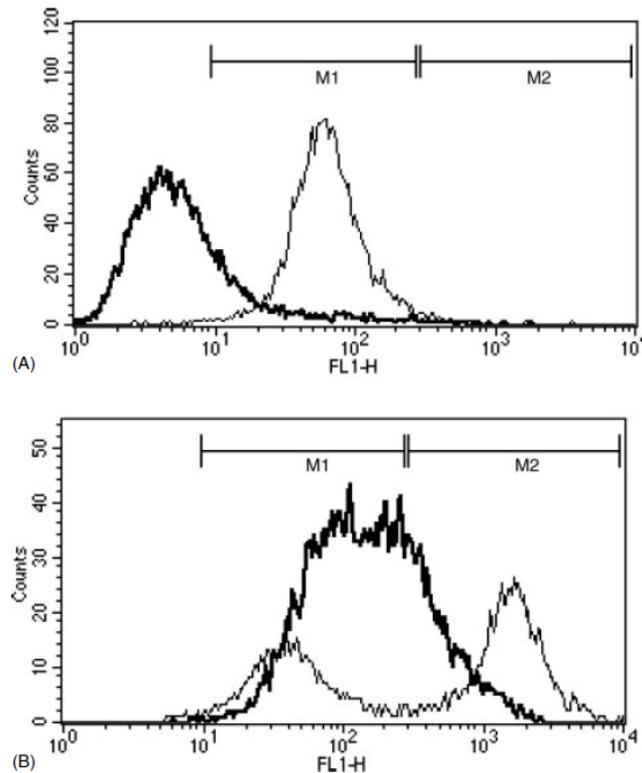


Figure 4. ROS synthesis in experimental (A) and control (B) HUVECs incubated with CCCP (50 nM) in the presence of 5, 15, and 30 mmol/L glucose. CCCP inhibited ROS synthesis in experimental HUVECs, whereas in control cells CCCP was associated with a slight inhibition of ROS+ cells. Bold line shows HUVECs with CCCP, whereas the thin line shows HUVECs without the uncoupler. The figure shows the results of a 48 h representative experiment

by mitochondria alone induces type 2 DM [34] and that high glucose concentrations affect the shape and Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> homeostasis of mitochondria in endothelial cells [35]. Interestingly, endothelial cells with type 1 DM background have a deficient glucose uptake [11] and probably a low ROS production. In contrast to our results other authors mention an overproduction of ROS together with an inhibition in cell proliferation in endothelial cells without diabetic background exposed to high glucose concentrations for periods of time above 48 h that we evaluated [36,37]. The latter suggests that the inhibition in cell proliferation by non-diabetic background endothelial cells is not ROS-dependent, as opposed to our experimental HUVECs.

We found an inhibition in ROS synthesis in the presence of CCCP independently of the HUVECs background, but interestingly the inhibition was more severe in experimental HUVECs. CCCP stimulates oxygen consumption [38], but in hepatic mitochondrias from diabetic rats it decreases respiration [39]. Our results suggest that mitochondrias from HUVEC from newborns with DM background have a diminished cellular respiratory capacity thus corroborating the results of Nishikawa *et al.* and Peterside *et al.* results [39,40].

Contrary to the results by Recchioni *et al.* and Ido *et al.* [27,41] we did not find alterations in the mitochondrial membrane potential probably because we used shorter experimental times and HUVECs with a diabetic background (data not shown). NAD(P)H-oxidase activity has been linked with endothelial cell damage in DM [42]. We found, contrary to control HUVECs, that there was no inhibition of ROS synthesis in experimental HUVECs incubated with DPI (an inhibitor of NAD(P)H-oxidase), thus suggesting that the activity of NAD(P)H-oxidase is abolished or has low activity, as a consequence of an altered utilization of glucose.

HUVECs with diabetic background showed a spontaneous cluster formation in the presence of 15 or 30 mmol/L of glucose, whereas control HUVECs had no changes. Rellier *et al.* [43], have shown that the carbohydrate composition of the glycoconjugates that constitute the glycocalix of microvascular cells, are modified in the presence of high glucose concentrations, affecting cell-cell interactions. Likewise, high glucose concentrations are known to induce changes in the morphology of endothelial cells, via the glucose-mediated reorganization of F-actin [44] and it also has been shown

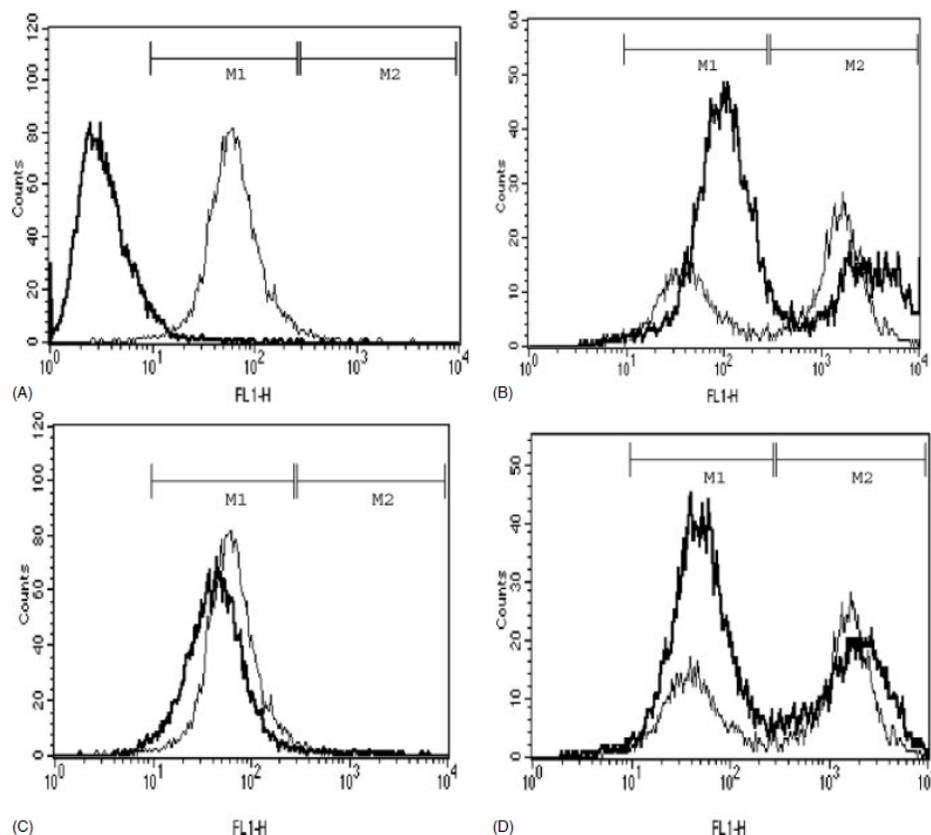


Figure 5. ROS synthesis in HUVECs incubated with cytochalasin (B) or DPI. Experimental HUVECs showed an inhibition in ROS synthesis (A), whereas the percentage of ROS+ cells in the M2 region of control HUVECs (B) showed a decrease in the presence of cytochalasin (B). In the presence of DPI, the percentage of ROS+ cells was slightly modified in the experimental HUVECs (C), whereas in control HUVECs (D) there was a diminution in the percentage of ROS+ cells in the M2 region and an increase in the M1 region. Bold line shows HUVECs with cytochalasin (B) or DPI, and the thin line shows HUVECs without cytochalasin (B) or DPI. The figure shows the results of a 48 h representative experiment

that the endothelial cell function may be modified by glycosylation pattern differences in the extracellular matrix of endothelial cells with type 1 DM background [11]. This endothelial damage might also be related to the greater retraction of fibrin clots, which promote the exposure of sub-endothelial layers and play a major role in thrombogenesis in HUVECs from infants with poorly controlled insulin dependent diabetic mothers [45].

We must emphasize that our results derive from individualized non-pooled HUVECs; the use of pooled HUVECs are known to produce important variations in some assays [46].

Endothelial damage in DM is mediated by ROS [36,47] although its source is controversial (activated leukocytes vs endothelial cells) [48]. Our results seem to confirm the endothelial cell as the most important ROS source and show that there is an increase in the susceptibility to develop metabolic alterations, in the presence of high glucose concentrations, in endothelial cells with a strong family diabetes background.

## Acknowledgements

N.A.V. received a post-graduate scholarship No. 169862 from CONACyT. This work was partially supported by Instituto Científico Pfizer-Mexico, CONACyT grant SALUD-2002-COI-7630, and PAPIIT-UNAM grant IN224906-2. The authors are grateful to Dr Gerardo Tinoco from the Hospital General de Zona de Troncoso, IMSS for umbilical cords and to Dr Faride Navari González for the clinical evaluation of the patients.

## References

1. Thamer C, Stumvoll M, Niess A, *et al.* Reduced skeletal muscle oxygen uptake and reduced beta-cell function: two early abnormalities in normal glucose-tolerant offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2126–2132.
2. McEleavy OD, McCallum RW, Petrie JR, *et al.* Higher carotid-radial pulse wave velocity in healthy offspring of patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21: 262–266.
3. Foss CH, Vestbo E, Froland A, *et al.* Insulin resistance is accompanied by increased von Willebrand factor levels in nondiabetic women: a study of offspring of type 2 diabetic

- subjects compared to offspring of nondiabetic subjects. *J Intern Med* 2002; 252: 155–163.
4. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1856–1862.
  5. Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci* 2004; 76: 715–730.
  6. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, et al. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 2004; 47: 1727–1734.
  7. Ozdemir G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P, Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 99–104.
  8. Nakanishi S, Suzuki G, Kusunoki Y, Yamane K, Egusa G, Kohno N. Increasing of oxidative stress from mitochondria in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 399–404.
  9. Elhadd TA, Kennedy G, Hill A, et al. Abnormal markers of endothelial cell activation and oxidative stress in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes with no clinical vascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15: 405–411.
  10. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004; 95: 233–238.
  11. Sank A, Wei D, Reid J, et al. Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease. *J Surg Res* 1994; 57: 647–653.
  12. Cester N, Rabini RA, Salvolini E, et al. Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 569–573.
  13. Vasquez G, Sanhueza F, Vasquez R, et al. Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium. *J Physiol* 2004; 560: 111–122.
  14. Sobrevia L, Yudilevich DL, Mann GE. Elevated D-glucose induces insulin insensitivity in human umbilical endothelial cells isolated from gestational diabetic pregnancies. *J Physiol* 1998; 506: 219–230.
  15. Paez A, Méndez-Cruz RA, Varela E, et al. HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction overexpress adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 449–458.
  16. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 2003; 52: 2795–2804.
  17. Du X, Matsumura T, Edelstein D, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 1049–1057.
  18. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005; 307: 384–387.
  19. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 216–222.
  20. Zapata E, Ventura JL, De la Cruz K, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the proliferation of human umbilical vein endothelial cells by enhancing the expression of p53 and p21, restricting the phosphorylation of retinoblastoma protein, and is androgen- and estrogen-receptor independent. *FEBS J* 2005; 272: 1343–1353.
  21. Alvarado-Vásquez N, Santiago J, Alcázar-Leyva S, Zenteno E, Negrete-García C, Alcázar-Montenegro H. A fungal tRNA of *Aspergillus niger* induces IFN- $\beta$  synthesis in HEp-2 cells. *Life Sci* 2005; 77: 578–588.
  22. Foutlier MT, Vonarx-Coinsmann V, Patrice T, Cloarec D, Xu XN, Combre A. Effects of high glucose concentration on survival and respiration of human endothelial cells. *Biochimie* 1992; 74: 975–979.
  23. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 1422–1428.
  24. Kalbacova M, Vrbacky M, Drahotova Z, Melkova Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry A* 2003; 52: 110–116.
  25. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813–820.
  26. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 2002; 21: 1616–1627.
  27. Recchioni R, Marcheselli F, Moroni F, Pieri C. Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by N-acetyl-L-cysteine. *Metabolism* 2002; 51: 1384–1388.
  28. Benetos A, Waeber B, Izzo J, et al. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. *Am J Hypertens* 2002; 15: 1101–1108.
  29. McSorley PT, Bell PM, Young IS, et al. Endothelial function, insulin action and cardiovascular risk factors in young healthy adult offspring of parents with Type 2 diabetes: effect of vitamin E in a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Diabet Med* 2005; 22: 703–710.
  30. Moldoveanu E, Tanaseanu C, Tanaseanu S, et al. Plasma markers of endothelial dysfunction in type 2 diabetics. *Eur J Intern Med* 2006; 17: 38–42.
  31. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 26–36.
  32. Polyarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* 2005; 510: 31–38.
  33. Arakaki N, Nagao T, Niki R, et al. Possible role of cell surface H<sup>+</sup>-ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 931–939.
  34. Ferreira MF, Palmeira MC, Seica R, Moreno JA, Santos MS. Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 214–222.
  35. Paltauf-Doburzynska J, Malli R, Graier WF. Hyperglycemic conditions affect shape and Ca<sup>2+</sup> homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 423–436.
  36. Kamal K, Du W, Mills I, Sumpio BE. Antiproliferative effect of elevated glucose in human microvascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 1998; 71: 491–501.
  37. Curcio F, Ceriello A. Decreased cultured endothelial cell proliferation in high glucose medium is reversed by antioxidants: new insights on the pathophysiological mechanisms of diabetic vascular complications. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; 28A: 787–790.
  38. Shen J, Khan N, Lewis LD, et al. Oxygen consumption rates and oxygen concentration in molt-4 cells and their mtDNA depleted (rho0) mutants. *Biophys J* 2003; 84: 1291–1298.
  39. Peterside IE, Selak MA, Simmolons RA. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1258–E1266.
  40. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787–790.
  41. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 2002; 51: 159–167.
  42. Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, et al. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 381–391.
  43. Rellier N, Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci* 1999; 64: 1571–1583.
  44. Lee HZ, Yeh FT, Wu CH. The effect of elevated extracellular glucose on adherens junction proteins in cultured rat heart endothelial cells. *Life Sci* 2004; 74: 2085–2096.
  45. Nappi C, Cerbone AM, Papa R, et al. Increased retraction of fibrin clots by endothelial cells of infants of diabetic mothers. *Biol Res Pregnancy Perinatol* 1985; 6: 141–142.
  46. Cristina de Assis M, Cristina Plotkowski M, Fierro IM, Barja-Fidalgo C, de Freitas MS. Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide* 2002; 7: 254–261.

47. Neri S, Signorelli SS, Torrisi B, *et al.* Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. *Clin Ther* 2005; 27: 1764–1773.
48. Zhang C, Yang J, Jennings LK. Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose-induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose-stimulated, vascular non-leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes* 2004; 53: 2950–2959.

**Capítulo V. Artículo: Reduced NO synthesis and eNOS mRNA expression in endothelial cells from newborns with a strong family history of type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2007; 23:559-66.**

**Introducción**

La historia familiar de la diabetes tipo (HFDM2) está asociada con la disfunción endotelial temprana, así como con una función vascular alterada en individuos con estos antecedentes, y en donde la baja disponibilidad del óxido nítrico (ON) parece jugar un papel preponderante. El incremento en la concentración fisiológica de glucosa tiene efectos negativos sobre la síntesis de ON, lo cual se asocia con la disfunción endotelial temprana en individuos con HFDM2, así como en mujeres embarazadas con diabetes gestacional. Se ha descrito que las células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVECs) de recién nacidos sanos con madres diabéticas tipo 1 presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa, en la estructura de su membrana plasmática, así como de sus mitocondrias. Uno de los principales transportadores de glucosa (GLUTs) en la célula endotelial es GLUT1, el cual se ha descrito, regula la síntesis de ON en la célula endotelial. En células endoteliales incubadas en concentraciones suprafisiológicas de glucosa se encontró una activación de p53, el cual está ligado con el inicio de la apoptosis. Sin embargo, investigaciones recientes mostraron el papel de p53 en la respiración mitocondrial así como en la expresión de GLUT1. Con estos antecedentes, consideramos importante determinar la presencia de metabolitos derivados del ON, la actividad mitocondrial, y la expresión de los transcritos de eNOS, GLUT1 y de p53 en HUVECs de recién nacidos sanos con HFDM2.

## **Resultados**

Después de la incubación de las células en presencia de glucosa (15mM/L o 30 mM/L), se encontró una disminución en el porcentaje de HUVECs con HFDM2 productoras de ON (11% en 5mM a 7.8% en 30 mM/L de glucosa). En contraste, el porcentaje de las HUVECs productoras de ON de los niños control aumento del 3% en 5 mM/L hasta el 31% en 30 mM/L de glucosa. Por otra parte, la expresión de los transcritos de eNOS y de p53 en las HUVECs de recién nacidos con HFDM2 disminuyo. Por el contrario, la expresión de los transcritos para eNOS fue mayor, mientras que la del transcrito de p53 no cambio en las HUVECs de los niños control incubadas en concentraciones suprafisiológicas de glucosa. Por otra parte, la expresión del transcrito de GLUT1 aumentó en las HUVECs de niños con HFDM2, y no cambio en las HUVECs de los niños control incubadas en 15 o 30 mM/L de glucosa.

## **Discusión**

Nuestros resultados revelaron que la síntesis de ON disminuyó en las HUVECs con HFDM2 incubadas en concentraciones suprafisiológicas de glucosa, disminución que se asoció con una expresión alterada de los transcritos de la eNOS, p53 y GLUT1, todos ellos elementos asociados con la expresión del ON. Evidencias previas sugerían que la disfunción endotelial en los pacientes con diabetes era consecuencia de la deficiente síntesis de ON, sin embargo este punto es aún controversial. Nuestros resultados, revelaron que el porcentaje de HUVECs positivas a la síntesis de ON fue menor únicamente en las células obtenidas de los recién nacidos con una HFDM2. Esta disminución en la síntesis del ON, estuvo asociado con una disminución en la expresión del transcrito de eNOS. Aunque la

expresión del transcrito de GLUT1, asociado recientemente con la regulación de la síntesis del ON aumento su expresión en comparación con lo observado en las HUVECs obtenidas de los niños control, este incremento puede ser consecuencia de una mayor degradación de GLUT1, hecho que se ha observado en células obtenidas de pacientes con DM2 u obesos. La proteína p53 interviene en el inicio de la apoptosis y senescencia de la célula endotelial, sin embargo, también regula la actividad mitocondrial y la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT4. Nuestros resultados revelaron que la expresión de p53 disminuyó en las HUVECs de niños con HFDM2, lo cual puede asociarse con la menor actividad mitocondrial observada en este trabajo. En conclusión las evidencias obtenidas mostraron una disminución en el número de células sintetizando ON, asociado esto con una disminución en la expresión del transcrito de la eNOS, de p53 y de GLUT1, en las células provenientes de recién nacidos sanos con HFDM2.

# Reduced NO synthesis and eNOS mRNA expression in endothelial cells from newborns with a strong family history of type 2 diabetes

Noé Alvarado-Vásquez<sup>1\*</sup>

Estrella Zapata<sup>2</sup>

Susana Alcázar-Leyva<sup>3</sup>

Felipe Massó<sup>2</sup>

Luis F. Montañó<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica,  
Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias, México

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular,  
Instituto Nacional de Cardiología  
"Ignacio Chávez", México

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones  
Científicas Hans-Selye, A.C.,  
Querétaro, Qro., México

<sup>4</sup>Laboratorio de Inmunología,  
Departamento de Bioquímica,  
Facultad de Medicina UNAM, 04510,  
México

\*Correspondence to:

Noé Alvarado-Vásquez,  
Departamento de Bioquímica,  
Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias, Calzada de Tlalpan  
4502, Col. Sección XVI, C.P. 14080,  
México. E-mail: nnooe@gmail.com

## Abstract

**Background** A deficient synthesis of nitric oxide (NO) may play a role in the early endothelial dysfunction of healthy humans with a strong family history of type 2 diabetes (DM2). In this study, we evaluate the intracellular synthesis of NO and the expression of eNOS transcripts in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), exposed to high glucose concentrations, of healthy newborns with (experimental) and without (control) a strong family history of DM2.

**Methods** HUVECs were incubated in M-199 culture media (containing a 5 mmol/L physiological glucose concentration) or supraphysiological glucose concentrations (15 or 30 mmol/L), for 48 h. Flow cytometry, reactive of Griess and RT-PCR were used to determine intracellular NO synthesis, presence of NO metabolites, and expression of eNOS, GLUT1 or p53 transcripts.

**Results** NO synthesis in experimental HUVECs showed a progressive reduction in the presence of increasing glucose concentration (11% for 5 mmol to 8% for 30 mmol;  $p < 0.01$ ), whereas control HUVECs showed an increase in NO synthesis (3% for 5 mmol to 31% for 30 mmol;  $p < 0.001$ ). In experimental HUVECs, we found a diminished expression of eNOS and p53, and also an enhanced expression of GLUT1 mRNA transcripts. Control HUVECs showed an increase in eNOS, and no modifications in p53 or GLUT1 mRNA transcripts.

**Conclusions** Our results show how HUVECs, isolated from healthy newborns with a strong family history of DM2, have an abnormal intracellular synthesis of NO and an impaired expression of eNOS, GLUT1 and p53 genes, all associated with NO synthesis. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** endothelium; glucose; type 2 diabetes mellitus; nitric oxide; nitric oxide synthase; reactive oxygen species

## Introduction

A strong family history of type 2 Diabetes Mellitus (DM2) is associated with endothelial dysfunction and impaired vascular function in healthy offspring and adult individuals [1,2], probably secondary to a lower availability of nitric oxide (NO). Glycaemic loads, even in the physiological range and reduced bioavailability of NO that can contribute to endothelial dysfunction, have been observed in healthy individuals with a strong family history of DM2, and in aortic tissue isolated from an animal model of DM2 [3–5].



Received: 8 November 2006

Revised: 12 February 2007

Accepted: 14 February 2007

A reduction in plasma cyclic-GMP concentration, which is the signalling pathway to initiate NO synthesis, has been shown in the plasma of individuals with a family history of DM2 [6]. Different reports have shown the presence of endothelial dysfunction in pregnant women with gestational diabetes [7]. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) isolated from healthy newborns with type 1 diabetic mothers are 20–40% less resistant to shear stress, take up glucose more slowly, have alterations in the plasma membrane, and show an increase in mitochondrial area [8,9], suggesting a wide range of adaptations.

It has recently been shown that GLUT1-dependent glucose metabolism regulates the synthesis of NO in the endothelial cells [10]. Signalling pathways for the biosynthesis and/or release of NO depend on the energy derived from the oxidative metabolism of glucose [11]. In endothelial cells, high glucose concentrations have been linked with overexpression of p53, and consequently, apoptosis or senescence [12,13]. Recent research has also proved that p53 is an important regulator of mitochondrial respiration in cells strongly dependent on glucose as its energy source [14].

Based on previously mentioned data, we believe that the endothelial dysfunction in healthy humans with a family history of DM2 might originate from an altered energetic metabolism, which in turn down-regulates the synthesis of NO, as some of our results suggest [15]. Therefore, the aim of this work was to determine the intracellular synthesis of NO, the presence of metabolites derived from NO, the mitochondrial activity, and the expression of eNOS, GLUT1 and p53 transcripts, in HUVECs from healthy newborns with a strong family history of DM2.

## Material and methods

### Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells [HUVECs]

Umbilical cords were obtained from six newborn offspring of young non-diabetic women (18–26 years old) with a strong family history of DM2 (three or more first degree relatives with the disease) (experimental HUVECs) or from 10 pregnant women (20–25 years old) without a family history of DM2 (control HUVECs). None of the mothers in either group had gestational diabetes at the time of delivery (Table 1). This study was approved by the Institutional Review Board and the Ethics committee. All patients signed a written informed consent. HUVECs were isolated from each individual cord using type II collagenase (0.2 mg/mL, GIBCO/BRL). Non-pooled cells were cultured in T-75 tissue culture flasks (NUNC) in M-199 (Sigma, St Louis) medium, supplemented as previously reported [15]. M-199 culture medium is considered as for endothelial cell culture [16,17]. The

formulation of the medium contains 5.5 mM D-glucose, therefore, for practical purposes the results obtained with HUVECs incubated in non-modified M-199 medium are considered basal values. In some experiments, the M-199 medium was complemented with additional glucose in order to reach a final glucose concentration of 15 or 30 mmol/L. Cells were used within passages 4–6 and were identified as endothelial by their morphology and by uniform positive endoglin (CD105) surface antigen (BD Pharmingen) staining.

### Cell proliferation and mitochondrial activity

HUVECs ( $5 \times 10^3$  cells) were cultured for 24 h in 96-multiwell tissue culture plates with 100  $\mu$ L of non-glucose supplemented M-199 culture medium (without phenol red). After this time, the culture medium was discarded and 100  $\mu$ L of fresh culture supplemented with 15 or 30 mmol/L glucose-complemented medium (without phenol red) was added to the cultures for a further 48 h. The plates were washed with phosphate buffer saline (PBS) (PBS: 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.01 M NaHPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, Ph 7.2) and stained with 100  $\mu$ L from 0.1% crystal violet solution (w/v) (sigma) in 70% ethanol for 20 min, after which the plates were washed with deionised water and air-dried. The bound dye was dissolved with 100  $\mu$ L of 10% acetic acid solution. Optical density was measured at 595 nm in a 96-multiwell-plate spectrophotometer (BIO-TEK Instruments, Winooski, USA). Crystal violet stain has allowed us to evaluate HUVECs cell viability as well as cellular proliferation in relation to the culture time [14]. Previous experiments with normal HUVECs have shown that the cell viability, in the absence of glucose in the

Table 1. Characteristics of the pregnant women

	Diabetic background	Control	P
<i>n</i>	6	10	
Age [years]	22.8 $\pm$ 3.0	22.3 $\pm$ 1.4	N.S.
Weight [kg]	84.9 $\pm$ 7.0	64.1 $\pm$ 1.9	0.003
Height [m]	1.55 $\pm$ 0.06	1.58 $\pm$ 0.03	N.S.
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	35.3 $\pm$ 4.9	25.6 $\pm$ 1.0	0.02
[range BMI]	30–47	24–27	–
Fasting glucose [mmol/L]	4.7 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.2	N.S.
[range mmol/L]	[4.1–5.5]	[4.1–4.7]	–
HbA <sub>1c</sub> [%]	5.5 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 0.4	N.S.
Pregnancies	1–2	1–2	–
Births	1–2	1–2	–
Characteristics of the newborn infants.			
<i>n</i>	6	10	
Weight [kg]	3.15 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.23	–
[range kg]	[2.350–3.550]	[2.800–3.600]	–
Height [m]	0.46 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.01	–

Data represent the mean  $\pm$  S.D. N.S., not statistically significant.

M-199 culture medium, diminishes rapidly after 4 h of culture time. Mitochondrial dehydrogenase activity was determined by the reduction of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL) in sterile PBS [18]. HUVECs incubated 48 h with medium alone or supplemented with either 15 or 30 mmol/L of glucose were loaded with 20  $\mu$ L of PBS-MTT for the last 4 h of the culture period. The MTT reduced end-product, formazan, was dissolved with 100  $\mu$ L of 0.04 N-HCl in isopropyl alcohol, and the absorbance was recorded at 570 nm. In some experiments, glucose transport was blocked with cytochalasin B (50 ng/mL, Sigma) simultaneously with MTT load for the last 4 h of culture time.

### Nitric oxide (NO) determination

Intracellular NO formation was determined using the fluorescent probe 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Endothelial cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were incubated in 6-multiwell culture dishes (NUNC). Control cultures were incubated with non-glucose supplemented medium, (without phenol red) whereas experimental cultures were exposed to 15 or 30 mmol/L glucose-supplemented medium for 48 h. In order to maintain the high glucose concentration and considering that in our experience HUVECs consume upto 20% of the glucose contained in a normal M199 culture medium, we renewed the culture medium every 24 h. At the end, the cell cultures were treated with trypsin solution (0.05% trypsin/1 mmol EDTA), centrifuged at 900 rpm for 6 min, resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.8 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  0.81 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.44 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.33 mmol/L, and glucose 5.5 mmol/L) and loaded with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate 8  $\mu$ M for 30 min [19]. Intracellular NO synthesis by HUVECs ( $1 \times 10^4$  cells) was analysed by flow cytometry (Becton Dickinson FacsCalibur instrument, San Jose, CA, USA). Positive controls consisted of HUVECs incubated with 2 mmol of SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine, Molecular Probes), a donor of nitric oxide. HUVECs culture medium was first treated with nitrate reductase before determining the concentration of nitrites, using the Griess reagent (Sigma). Briefly, 96-multiwell tissue culture plates with 100  $\mu$ L of the culture medium obtained from the different experimental conditions and 100  $\mu$ L of the reagent were incubated for 15 min, before the absorbance was evaluated at 540 nm in a 96-multiwell plate spectrophotometer (BIO-TEK). The concentration of nitrites was obtained by comparison with a standard curve of sodium nitrite. The results are expressed as pM per  $\mu$ g of protein, which was determined by the micro Lowry method.

### RT-PCR

Total RNA was extracted from  $1 \times 10^6$  HUVECs cells incubated for 48 h in the different glucose concentrations previously mentioned, using 1 mL of Trizol (Molecular Research Center Inc). The RNA pellet was resuspended in diethyl pyrocarbonate-treated water and its concentration was determinate in a Lambda 18 Spectrometer (Perkin Elmer, Germany) at 260 nm. RNA (1  $\mu$ g) was mixed with 1  $\mu$ L of oligo-d[T], 4  $\mu$ L of 5 $\times$  reverse transcriptase first-strand buffer, and 10  $\mu$ L of diethyl pyrocarbonate-treated water. Reverse transcription was performed using 20 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. The RT mixture was incubated at 42°C for 50 min and then at 70°C for 15 min. The resulting cDNA was amplified by PCR. The primers for eNOS were 5'-CCA GCT AGC CAA AGT CAC CAT-3' (upstream) and 5'-GTC TCG GAG CCA TAC AGG ATT-3' (downstream), the amplified product was of 350 pb. Primers for Glut1 were 5'-TGT CCT ATC TGA GCA TCG TG-3' (upstream) and 5'-CTC CTC GGG TGT CTT ATC AC-3' (downstream), with an amplified product of 353 pb, and the primers for p53 were 5'-ACA TCT GGC CTT GAA ACC-3' (upstream) and 5'-AAC AAA GCG AGA CCC AGT-3' (downstream), with a amplified product of 351pb [20]. The conditions for PCR were 94°C for 1 min (denaturation), 55°C for 1 min (annealing), and 72°C for 2 min (extension) in a Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). The primers for  $\beta$ -actin, used as internal control, were 5'-CGT TCA CCT TGA TGA GCC CAT T-3' (upstream) and 5'-TCC AAG GGT CCG CTG CAG GTC-3' (downstream), with a final amplified product of 230 pb [21]. After 35 cycles, PCR products were detected by electrophoresis on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide, each band was analysed and its optical density was determined in an UVP image analyser (Ultraviolet Products, CA, USA) at 255 nm using the Labworks 4.0 image acquisition and analysis software. The results of eNOS, GLUT1 and p53 mRNA expression derive from the ratio calculated from their optical density divided by the correspondent optical density of the  $\beta$ -actin band,  $\times 100$ .

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS v 11 software. Variance analysis, followed by Student's *t*-tests and Dunnett's test, was used. Results are shown as mean  $\pm$  S.D. Statistical significance was considered as  $p < 0.05$ .

## Results

### Nitric oxide

Increasing concentrations of glucose reduced the proportion of HUVECs synthesizing intracellular NO, in

the experimental group. The amount of NO positive cells diminished from a  $11.7 \pm 1.4$  with 5 mmol glucose to  $10.2 \pm 1.2$  with 15 mmol, and  $7.8 \pm 2.0$  with 30 mmol (Figure 1(A–C)) ( $n = 6$ ). Contrary to experimental HUVECs control HUVECs showed an increase from  $3.5 \pm 0.5$  with 5 mmol glucose, to  $8 \pm 1.7$  with 15 mmol glucose, and  $30.7 \pm 3.3$  with 30 mmol glucose (Figure 1(D–F)). The intragroup and intergroup differences reached statistical significance ( $p < 0.01$ ).

The concentration of nitrites in experimental HUVECs was  $185 \pm 6.0$  pM with 5 mmol glucose,  $210 \pm 4.0$  pM with 15 mmol, and  $220 \pm 8.0$  pM with 30 mmol. The intragroup differences were not statistically significant. In opposition, control HUVECs ( $340 \pm 20$  pM,  $700 \pm 18$  pM, and  $490 \pm 14$  pM, respectively) showed a statistically significant intragroup difference ( $p < 0.01$ ). The differences between both experimental and control HUVECs were significant for intracellular NO synthesis as well as for nitrites concentration ( $p < 0.01$ ) (Figure 2).

### Mitochondrial activity

Mitochondrial activity in control HUVECs showed an increase in the presence of 15 mmol glucose ( $90 \pm 7\%$ ), or 30 mmol glucose ( $80 \pm 6\%$ ). Opposing results were observed in experimental HUVECs which showed an  $85 \pm 7.0\%$  inhibition after 48 h of culture with 15 or 30 mmol glucose (Figure 3(A)) ( $p < 0.001$ ). The incubation of HUVECs in the presence of cytochalasin B (an inhibitor of glucose transport) (Figure 3(B)) generated a 95% inhibition of mitochondrial activity,

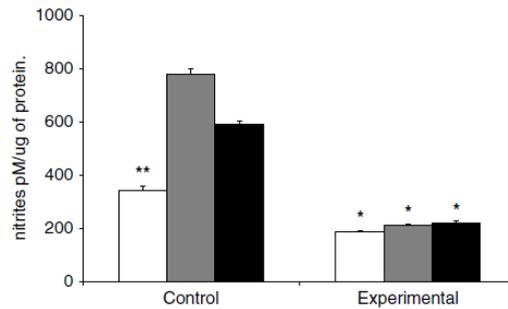


Figure 2. Concentration of nitrites in culture medium of control and experimental HUVECs incubated for 48 h with different glucose concentrations. The white bar corresponds to results obtained from cells incubated with M-199 culture medium (that contains 5 mM D-glucose) (see material and methods). The grey and black bars correspond to results obtained from cells incubated with M-199 culture medium supplemented with D-glucose to a final concentration of 15 mmol/L (grey) or 30 mmol/L (black). Intragroup differences were not statistically significant in the experimental HUVECs as opposed to control HUVECs (\*\*  $p < 0.01$ ). The differences between experimental and control HUVECs were highly significant for nitrites concentration (\*  $p < 0.01$ )

as determined by a reduction of MTT, independently of glucose concentration or origin of the endothelial cell.

### eNOS, GLUT1 and p53 mRNA

eNOS mRNA expression was increased in control HUVECs. This increase correlated positively with the increase

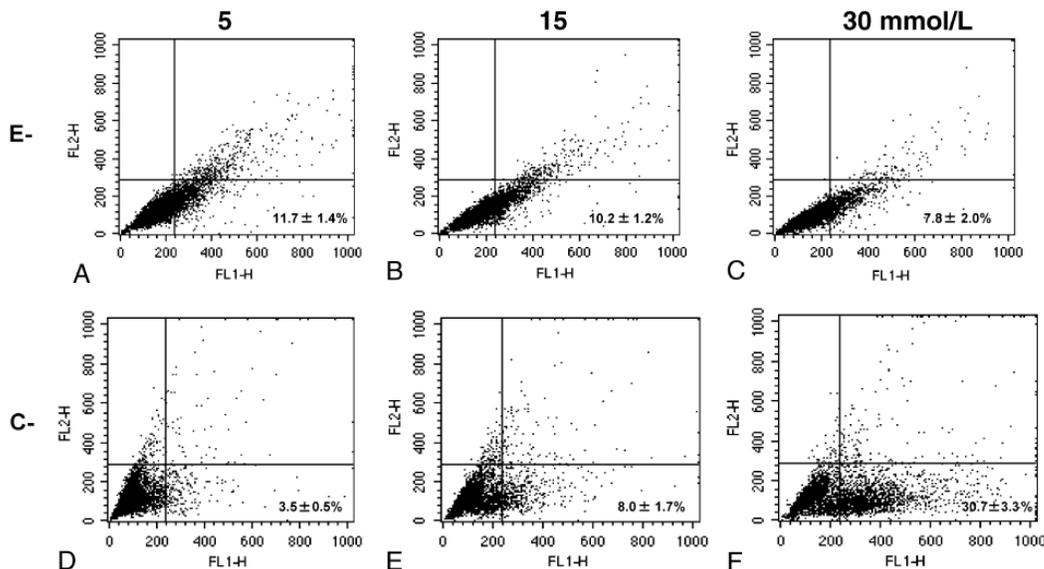


Figure 1. Intracellular NO synthesis determined by flow cytometry using 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate, by experimental [E-] and control [C-] human umbilical vein endothelial cells exposed to 5, 15 and 30 mmol glucose concentration for 48 h. The figure is representative of all the experiments performed [E,  $n = 6$ ; C,  $n = 10$ ] whereas the number inside the lower right quadrant in each figure represents the mean percentage of positive cells  $\pm$  the standard deviation of the mean

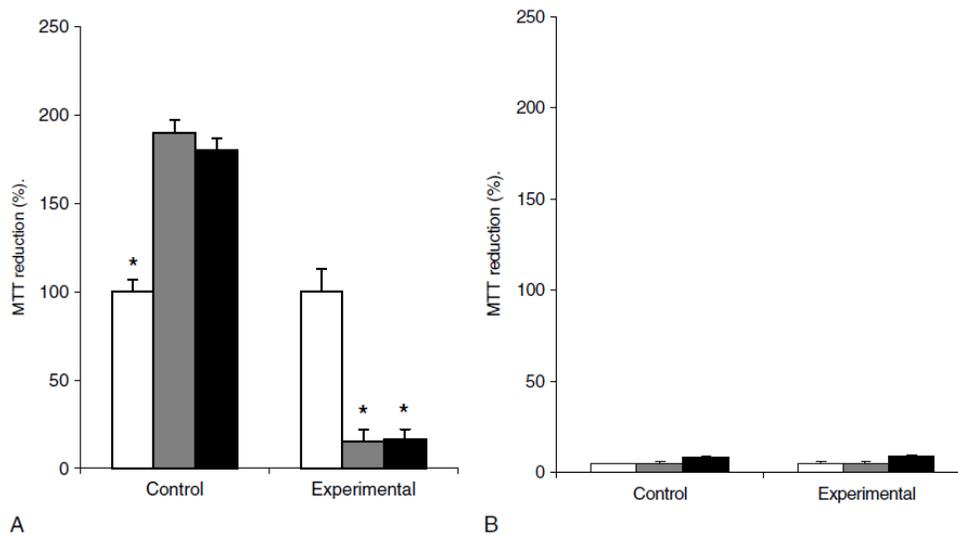


Figure 3. Mitochondrial activity of HUVECs. The white bar corresponds to results obtained with cells incubated with M-199 culture medium (that contains 5 mmol/L D-glucose)(see material and methods). The grey and black bars correspond to results obtained from cells incubated with M-199 culture medium supplemented with D-glucose to a final concentration of 15 mmol/L (grey) or 30 mmol/L (black). Control HUVECs showed a statistical significant increase in mitochondrial activity in the presence of 15 mmol glucose or 30 mmol glucose (\*  $p < 0.01$ ). Opposing results were observed in experimental HUVECs which showed an  $85 \pm 7.0\%$  inhibition after 48 h of culture with 15 or 30 mmol glucose (Figure 3(A)). The reduction of MTT in the presence of cytochalasin B (Figure 3(B)) showed a 95% inhibition of mitochondrial activity in all the HUVECs independently of glucose concentration or origin of the endothelial cell

in glucose concentration. The opposite was observed in experimental HUVECs which showed a progressive decrease in eNOS mRNA expression as the glucose concentration was being increased (Figure 4(A)) ( $p < 0.01$ ). The increase in glucose concentration had not effect in GLUT1 mRNA expression in control HUVECs, whereas a drastic increase in the ratio of GLUT1 mRNA expression was observed in experimental HUVECs incubated with 15 or 30 mmol glucose (Figure 4(B),  $p < 0.01$ ). Non-significant variations in the expression of p53 mRNA was observed in control HUVECs, independently of the glucose concentration. Interestingly, in experimental HUVECs the increase in glucose concentration induced a reduction on the p53/ $\beta$ -actin ratio particularly in endothelial cells incubated with 30 mmol glucose ( $p < 0.01$ ) (Figure 4(C)).

## Discussion

Genetic and metabolic factors have been implicated in the pathogenesis of micro and macro diabetic angiopathy [1,2,22]. Although there is evidence suggesting that vascular dysfunction in diabetic patients originates from a deficient synthesis of NO, the issue is still controversial. Our results showed reduced intracellular synthesis of NO in HUVECs isolated from newborns with a strong family history of DM2, when exposed to a high concentration of glucose.

The number of patients in the experimental group is small because of the difficulty in finding pregnant women with a strong DM2 family history; endothelial cell findings can therefore be attributed mainly to DM. Studies on non-diabetic adults with a family history of DM have shown abnormalities in the endothelial function [3]. Because of the infeasibility in obtaining endothelial cells from normal and diabetic adults, we cannot prove that our results with HUVECs can be extrapolated, although it is highly probable that similar abnormalities might be present. Initial results with HUVECs obtained from newborns with a weak family history of DM2 (non-first degree relatives), have shown that the percentage of cells synthesizing NO is comparable to the percentage values observed in the control group (data not shown).

Our results in experimental HUVECs, as opposed to control HUVECs, showed a significant down-regulation of NO intracellular synthesis while glucose concentration was being increased. An abnormal relaxation of the endothelium following the administration of an NO inducer, and a low bioavailability of NO, have been reported in individuals at risk of DM2 [2,3,5].

The expression of eNOS protein in endothelial cells exposed to high glucose concentrations is time dependent [23]. The first hours of exposure up-regulate eNOS and induce a maximal peak of expression that prevents endothelial cell apoptosis [24]. Longer exposure induces deregulation of eNOS activity with the consequent diminution in NO synthesis and increased cell apoptosis

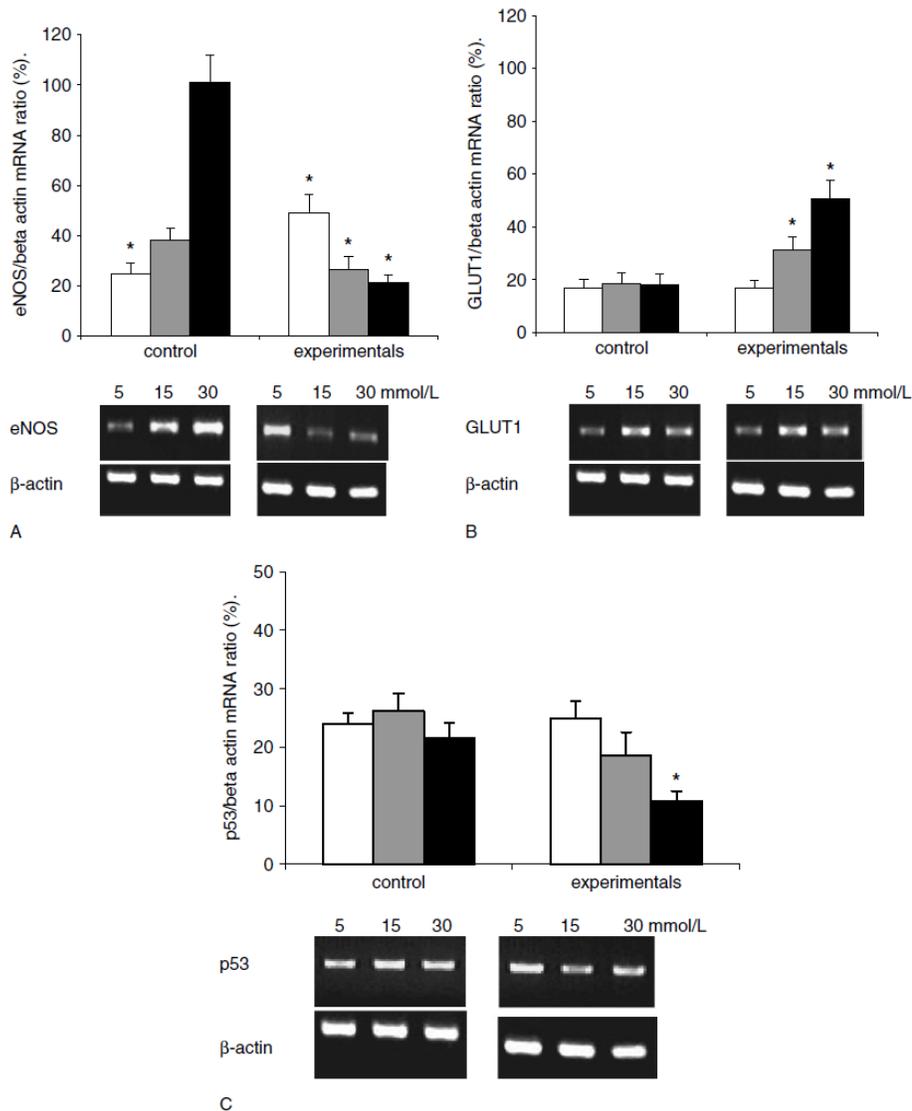


Figure 4. Determination by RT-PCR of eNOS (A), GLUT1 (B) and p53 (C) in control and experimental HUVECs exposed to 5 (white bar), 15 (grey bar) and 30 (black bar) mmol glucose concentration for 48 h. The results represent the ratio generated by dividing the values of the above mentioned amplified transcripts and constitutive  $\beta$ -actin determined by optical density. The white bar shows the results obtained with 5 mmol glucose, grey with 15 mmol, and black with 30 mmol. \* $p < 0.05$  of the experimental HUVECs in comparison with their respective control HUVECs

[25,26]. The diminished values of intracellular NO in experimental HUVECs could result from a reduced expression of eNOS, as our results suggest. Sorrenti *et al.* [27] have shown a similar inhibition in the presence of high glucose concentrations. The basal increase of NO values in experimental HUVECs could be the result of long-term exposure to L-arginine, a recognized NO synthesis substrate [28]. All mothers in this group had a body mass index greater than 30, which can be associated with an increase in L-arginine serum concentration because of overweight [29]. Endothelial NO

synthesis is a complex phenomena regulated by genomic and non-genomic pathways that require multi-site eNOS phosphorylation of four specific serines (inducers of NO synthesis) and one threonine (inhibitor of NO synthesis) residue [30]. It has been shown that phosphorylation of one serine residue is lower in diabetic patients [31].

The decrease of nitrite concentration in control HUVECs exposed to 15 or 30 mmol glucose, could be the result of peroxynitrite accumulation [32] which is not detected by the Griess reagent.

Control HUVECs exposed to high glucose concentrations showed an increase in mitochondrial activity, whereas in experimental HUVECs such activity was diminished. The effects of high glucose concentrations were not the result of prominent osmotic activity because the inhibition of glucose transport with cytochalasin B abolished mitochondrial activity. High L-glucose concentrations used as control sugar in epithelial cells and in adipocytes, provoke hyperosmotic shock and glucose transporter 1 translocation [33], proving L-glucose unreliable. High D-mannitol concentrations stimulate endothelial cell apoptosis [34]. Additionally, our results in control HUVECs did not show an increase in GLUT 1 expression.

Our previous results had shown that mitochondria of experimental HUVECs had an innate deficient response to either the presence of high glucose concentrations or to a mitochondrial respiration stimulator [15]. Other reports have shown a deficient uptake of glucose and an increase in the mitochondrial area of HUVECs isolated from newborns with type 1 diabetic mothers [8,9], and from normal endothelial cells incubated with high glucose concentrations for large periods of time [35]. The malfunction of the mitochondria would reduce the synthesis of energy necessary for cell-signalling processes and/or biosynthesis and/or release of NO in the endothelial cell [11].

The regulation of NO synthesis is highly dependent on the energy derived from GLUT1-dependent glucose metabolism [10]. We did not observe modifications in the GLUT1/ $\beta$ -actin ratio in control HUVECs; however, in experimental HUVECs there was a drastic increase in the GLUT1/ $\beta$ -actin ratio. The expression of glucose transporters is a highly regulated process that varies according to the tissue needs; therefore, the difference in GLUT 1 expression might be the result of malfunction in the endothelial signalling pathways that regulate GLUTs expression in normal endothelial cells [36]. A primary abnormality in glucose transport and GLUT1 cell-surface content has been shown in fibroblasts and in cell membranes from skeletal muscle cells isolated from DM2 and obese individuals [37]. Genetic analysis suggests that GLUT1 polymorphism may contribute to the development of DM2, especially in overweight/obese women [38].

p53 intervenes in apoptosis or senescence of the endothelial cell exposed to high glucose concentrations [12,13]. However, the importance of p53 in the metabolic activity of the endothelial cell is unknown. Recent data has shown the relevance of genetic changes in p53 expression and in mitochondrial respiration regulation, in cells strongly dependent of glucose as their source of energy [14]. p53 represses GLUT1 and GLUT4 gene transcription, diminishing glucose metabolism [39]. Our results did not show significant changes in the ratio of p53/ $\beta$ -actin expression in control HUVECs exposed to high glucose concentrations, while in experimental HUVECs they showed a glucose-concentration dependent decrease, which could cause a diminished concentration of p53 protein. Nevertheless, it has been shown in embryos that high glucose activates pathways such as hypoxia [40]

thus inducing glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  [41]. The latter would explain the increase in GLUT1 mRNA in experimental HUVECs incubated with 30 mmol glucose.

In conclusion, this study suggests that deficient NO synthesis, as well as altered expression of eNOS transcripts in HUVECs obtained from healthy newborns with a family history of DM2, might be associated with the early endothelial dysfunction observed in these individuals. This underlines the relevance of studying the transcription and translation of genes involved in the metabolic activity of endothelial cells. Recent evidence proves that insulin resistance in pre-diabetes is associated with a reduced expression of genes encoding key enzymes in the oxidative metabolism and the mitochondrial function [42,43]. This highlights the importance of oxidative metabolic pathways in the pathogenesis of DM2.

## Acknowledgements

N.A.V. is the recipient of a CONACyT postgraduate scholarship [No. 169862]. This work was partially supported by Instituto Científico Pfizer, CONACyT grants SALUD-2002-COI-7630, SALUD-2006-C01-44569 and PAPIIT-UNAM grant IN224906-2. The authors are grateful to Dr Gerardo Tinoco from the Hospital General de Zona de Troncoso, IMSS for the umbilical cords and to Dr Faride Navari González for the clinical evaluation of the patients.

## References

1. Thamer C, Stumvoll M, Niess A, *et al.* Reduced skeletal muscle oxygen uptake and reduced beta-cell function: two early abnormalities in normal glucose-tolerant offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; **26**: 2126–2132.
2. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, *et al.* Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; **48**: 1856–1862.
3. Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, *et al.* Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 2456–2461.
4. Reynolds SS, Yanek LR, Vaidya D, *et al.* Glucose levels in the normal range predict incident diabetes in families with premature coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; **74**: 267–273.
5. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005; **511**: 53–64.
6. Piatti PM, Monti LD, Zavaroni I, *et al.* Alterations in nitric oxide/cyclic-GMP pathway in nondiabetic siblings of patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 2416–2420.
7. Paradisi G, Biaggi A, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy: association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care* 2002; **25**: 560–564.
8. Sank A, Wei D, Reid J, *et al.* Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease. *J Surg Res* 1994; **57**: 647–653.
9. Cester N, Rabini RA, Salvolini E, *et al.* Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur J Clin Invest* 1996; **26**: 569–573.
10. Park JL, Heilig CW, Brosius FC III. GLUT1-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Eur J Pharmacol* 2004; **496**: 213–214.

11. Cappelli-Bigazzi M, Battaglia C, Pannain S, Chiariello M, Ambrosio G. Role of oxidative metabolism on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated vessels. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 871–879.
12. Rosso A, Balsamo A, Gambino R, *et al.* p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem* 2006; 281: 4339–4347.
13. Amore A, Cirina P, Conti G, *et al.* Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 53–60.
14. Matoba S, Kang JG, Patino WD, *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006; 312: 1650–1653.
15. Alvarado-Vásquez N, Paez A, Zapata E, *et al.* HUVECs from newborns with a strong family history of diabetes show diminished ROS synthesis in the presence of high glucose concentrations. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 71–80.
16. Di Stefano R, Santoni T, Barsotti MC, *et al.* Different growth conditions for peripheral blood endothelial progenitors. *Cardiovasc Radiat Med* 2002; 3: 172–175.
17. Huang YS, Huang WL, Lin WF, Chen MC, Jeng SR. An endothelial-cell-enriched primary culture system to study vascular endothelial growth factor (VEGF A) expression in a teleost, the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 145: 33–46.
18. Foultier MT, Vonarx-Coinsmann V, Patrice T, Cloarec D, Xu XN, Combre A. Effects of high glucose concentration on survival and respiration of human endothelial cells. *Biochimie* 1992; 74: 975–979.
19. Sheng JZ, Wang D, Braun AP. DAF-FM [4-amino-5-methylamino-2',7'-difluoro fluorescein] diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 931–940.
20. Ferreiro CR, Chagas ACP, Carvalho MHC, *et al.* Expresión of Inducible Nitric Oxide Synthase is Increased in Patients with Heart Failure due to Ischemic Disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1313–1320.
21. Kim WS, Kim YY, Jang SJ, Kimm K, Jung MH. Glucose Transporter 1 [GLUT1] Expression is Associated with Intestinal Type of Gastric Carcinoma. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 420–424.
22. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, *et al.* Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101: 1780–1784.
23. Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Shiah SG, Lin-Shiau SY. Nitric oxide prevents apoptosis of human endothelial cells from high glucose exposure during early stage. *J Cell Biochem* 1999; 75: 258–263.
24. Ho FM, Lin WW, Chen BC, *et al.* High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal* 2006; 18: 391–399.
25. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, *et al.* Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 2004; 47: 1727–1734.
26. Lin LY, Lin CY, Ho FM, Liao CS. Up-regulation of the association between heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase prevents high glucose-induced apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2005; 94: 194–201.
27. Sorrenti V, Mazza F, Campisi A, Vanella L, Li Volti G, Di Giacomo C. High glucose-mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells. *Curr Neurovasc Res* 2006; 3: 49–54.
28. Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 1993; 73: 217–222.
29. DeSouza CA, Van Guilder GP, Greiner JJ, Smith DT, Hoetzer GL, Stauffer BL. Basal endothelial nitric oxide release is preserved in overweight and obese adults. *Obes Res* 2005; 13: 1303–1306.
30. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 271–279.
31. Sasso FC, Torella D, Carbonara O, *et al.* Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 827–834.
32. Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Hobbs GR, Baylis C. Peroxynitrite versus nitric oxide in early diabetes. *Am J Hypertens* 2003; 16: 761–766.
33. Hirsch C, Haller C. Effect of extracellular hypertonicity and alkalosis on endothelial-derived EA.hy 926 cells in vitro. *Eur J Med Res* 2004; 9: 71–77.
34. Malek AM, Goss GG, Jiang L, Izumo S, Alper SL. Mannitol at clinical concentrations activates multiple signaling pathways and induces apoptosis in endothelial cells. *Stroke* 1998; 29: 2631–2640.
35. Mandal AK, Ping T, Caldwell SJ, Bagnell R, Hiebert LM. Electron microscopic analysis of glucose-induced endothelial damage in primary culture: possible mechanism and prevention. *Histol Histopathol* 2006; 21: 941–950.
36. Mann GE, Yudlevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003; 83: 183–252.
37. Miele C, Formisano P, Condorelli G, *et al.* Abnormal glucose transport and GLUT1 cell-surface content in fibroblasts and skeletal muscle from NIDDM and obese subjects. *Diabetologia* 1997; 40: 421–429.
38. Pontiroli AE, Capra F, Veglia F, *et al.* Genetic contribution of polymorphism of the GLUT1 and GLUT4 genes to the susceptibility to type 2 [non-insulin-dependent] diabetes mellitus in different populations. *Acta Diabetol* 1996; 33: 193–197.
39. Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 2004; 64: 2627–2633.
40. Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 2–10.
41. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, *et al.* Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol* 2004; 183: 145–154.
42. Patti ME. Gene expression in humans with diabetes and prediabetes: what have we learned about diabetes pathophysiology? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 383–390.
43. Patti ME. Gene expression in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2004; 4: 176–181.

## **Capítulo VI. Discusión.**

La importancia de la DM2 como problema de salud a nivel mundial está bien establecida, la gran cantidad de pacientes con diabetes (346 millones) y los fallecimientos asociados con, o como consecuencia de la enfermedad a nivel mundial destacan lo anterior. Este panorama se muestra más desalentador, si consideramos que un altísimo porcentaje de las muertes suceden en los países de ingresos bajos y medios (80%), en donde algunos estudios indican que el número de enfermos aumentara de manera drástica en los próximos años (59).

La elevación en la concentración de glucosa en sangre que identifica a la enfermedad, se asocia con el desarrollo de las alteraciones micro- y macrovasculares de la retina, riñón o cerebro del paciente con DM (3-5). En relación a esto, se ha demostrado que la historia familiar de la diabetes tipo 2 (HFDM2), es un factor de riesgo importante para el inicio temprano de la disfunción vascular. En hijos de madres con DM2, así como en sujetos en riesgo de padecer diabetes se ha observado una funcionalidad micro- y macrovascular alterada. Por esta razón, se comenzó a considerar a la HFDM2, como un determinante importante de la función endotelial a futuro en estos individuos. Sin embargo, a pesar de estas evidencias, se desconoce la manera como la HFDM2 influye en la respuesta endotelial al estrés derivado por la hiperglucemia en los sujetos con estos antecedentes.

Uno de los primeros resultados observados en este trabajo fue que las HUVECs de recién nacidos con HFDM2 presentaron una agregación espontánea en presencia de 15 o 30 mmol de glucosa. Evidencias previas han descrito modificaciones en los glicoconjugados del glicocálix de las células vasculares en

presencia de concentraciones elevadas de glucosa. Alteraciones similares en la morfología celular en células endoteliales de individuos con antecedentes de DM1 se han reportado, y aunque se ha propuesto que derivan de alteraciones en la estructura de los glucosaminoglicanos, los mecanismos exactos aún se desconocen (103). Nuestros resultados por lo tanto, sugieren que las HUVECs con HFDM2 son más sensibles a la variación en la concentración de glucosa.

La célula endotelial interviene en un gran número de funciones fisiológicas (79,80), lo cual tiene consecuencias para la funcionalidad orgánica en general (78). Su capacidad de sintetizar compuestos que regulan la función de los diferentes tipos celulares en el organismo, está relacionada con su capacidad de variar su forma y tamaño de acuerdo al sitio o función que esté realizando (83-85). Los resultados obtenidos en este trabajo y mostrados en el análisis inicial por citometría de flujo, revelan que las HUVECs de recién nacidos con HFDM2 conforman una sola población de menor tamaño celular. En comparación con las HUVECs de niños sin HFDM2, en donde se pudieron observar dos poblaciones celulares claramente diferenciables por tamaño y granularidad. Lo encontrado en este trabajo por lo tanto sugiere, que la variación en el tamaño y granularidad asociados con la funcionalidad de la célula endotelial, se encuentra limitada en las HUVECs provenientes de los niños con HFDM2. Estos datos podrían por lo tanto ayudar a explicar la función micro- y macrovascular alterada (99-101), observada en los pacientes con HFDM2. Sin embargo, los mecanismos exactos que asocian morfología y funcionalidad, aún se desconocen.

De acuerdo con algunos autores el desarrollo de las alteraciones micro- y macrovasculares, derivan del estrés oxidativo, así como de una alterada síntesis

de ON en el paciente con diabetes. Sin embargo, sabemos asimismo, que los ROS y el ON intervienen regulando la viabilidad, proliferación y funcionalidad de la célula endotelial, así que: ¿en qué momento pasan los ROS a ser agentes dañinos para el endotelio?, o bien, ¿en qué momento se observa una disminución en la síntesis de ON?, se desconoce con exactitud. Así como desconocíamos, si la síntesis de estos dos importantes agentes para la célula endotelial, podían verse afectados en las células de individuos con una HFDM2. Nuestros resultados revelaron que las diferencias en la morfología endotelial se asoció con cambios en la síntesis de ROS. Las HUVECs provenientes de niños con HFDM2 tuvieron un menor porcentaje de células sintetizando ROS, en comparación con las células provenientes de niños sin HFDM2 después de mantenerlas en cultivo en concentraciones suprafisiológicas de glucosa. Asimismo, nuestros resultados revelaron a una única población positiva a la síntesis de ROS, en contraste con las HUVECs de niños sin HFDM2 en donde se pudo observar a dos poblaciones con diferente nivel de síntesis de estos radicales. Resultados similares se obtuvieron al evaluar la síntesis del ON. Se encontró que las HUVECs con HFDM2 incubadas en concentraciones suprafisiológicas de glucosa, tuvieron un menor porcentaje de células sintetizando ON. En comparación, el porcentaje de HUVECs sin HFDM2 sintetizando ON aumento de manera significativa en presencia de concentraciones elevadas de glucosa. Nosotros encontramos que al comparar estos resultados con los obtenidos después de evaluar la proliferación y la actividad mitocondrial, las células endoteliales obtenidas de niños con HFDM2 presentaron una menor síntesis de ROS y ON, asociado con una menor proliferación y actividad mitocondrial. Nuestros resultados sugieren por lo tanto,

que las variaciones en la actividad vascular pueden estar asociadas con cambios ligados con la síntesis de ROS y de ON, los cuales son importantes reguladores de la funcionalidad, proliferación y muerte de la célula endotelial (91, 102). Por esto, el riesgo para el inicio de la enfermedad cardiovascular en el individuo con HFDM2, puede estar asociado con la deficiente síntesis de mediadores ligados con la funcionalidad de la célula endotelial. Resultados encontrados en otros estudios, consideran que los ROS son sintetizados principalmente por la NAD(P)H oxidasa o por la cadena respiratoria mitocondrial de la célula endotelial, lo cual depende del metabolismo de la glucosa. En relación a esto, se ha visto que el transporte de glucosa a través de GLUT1 se asocia con la síntesis de ROS y del ON, por esta razón consideramos adecuado evaluar la expresión de los transcritos de este transportador en las HUVECs con y sin HFDM2. Nuestros resultados mostraron que las HUVECs de niños con o sin HFDM2 incubadas con un inhibidor de la NADPH oxidasa, tuvieron un efecto mínimo. En el caso de las HUVECs de niños sin HFMD2, solo una de las dos poblaciones positivas a la síntesis de ROS fue afectada por la presencia del inhibidor. No se observó lo mismo al incubar las HUVECs con un inhibidor del transporte de glucosa, o bien con un desacoplante mitocondrial, estos inhibieron de manera drástica la síntesis de ROS en las HUVECs de niños con HFDM2, mientras que en las células endoteliales de niños sin HFDM2, una de las dos poblaciones celulares productoras de ROS fue nuevamente la afectada. Estos resultados indican por lo tanto que aunque la NAD(P)H oxidasa produce ROS en la célula endotelial, es la mitocondria el principal generador de ROS en este tipo celular. Asimismo, nuestros resultados mostraron que la generación de ROS estuvo asociada con el transporte de

glucosa. En este punto es importante mencionar, que las células endoteliales de individuos con antecedentes de diabetes mellitus tipo 1, o HUVECs de recién nacidos con madres diabéticas tipo 1 presentan una deficiente captura de glucosa, fueron menos resistentes al estrés por fricción, presentaron alteraciones a nivel de la membrana celular, así como una estructura mitocondrial alterada. Estas evidencias y nuestros resultados sugieren por lo tanto, que el inadecuado transporte de glucosa está ligado con la deficiente síntesis de ROS observada en la HUVECs de niños con HFDM2.

En relación al ON, existe evidencia que sugiere que la disfuncionalidad endotelial proviene de la deficiente síntesis de ON, sin embargo, el tema aún es controversial. Es importante mencionar que los resultados acerca de la expresión de la eNOS, así como de la síntesis del ON obtenidos en otros trabajos no son concluyentes. De acuerdo con algunos autores la expresión del transcrito de la eNOS o de la síntesis del ON depende del tiempo de exposición a la glucosa. Sin embargo, también se ha encontrado que la exposición aguda a las concentraciones suprafisiológicas de glucosa inhibe la síntesis del ON. Para hacer aún más complejo el panorama, el análisis de datos ya publicados indica que los tiempos en los cuales los autores encuentran variaciones en la síntesis del ON son muy variables. Nuestros resultados, revelaron que la síntesis del ON en las HUVECs de niños con HFDM2 se inhibió claramente en presencia de concentraciones suprafisiológicas de glucosa a las 48 horas, en comparación un incremento en la síntesis del ON en las HUVECs de los niños sin HFDM2 incubadas con las mismas concentraciones de glucosa fue observada. En este punto es importante mencionar, que aunque algunos autores han encontrado que

las células endoteliales incubadas en concentraciones mayores a 5mM/L de glucosa, muestran una deficiente síntesis de ON, estos autores nunca consideraron a la HFDM2 como un elemento importante a considerar en sus trabajos, lo cual podría explicar los resultados encontrados por ellos. Por otra parte, existen evidencias que muestran un efecto mínimo de un inductor del ON, así como una baja disponibilidad de esta molécula en las células endoteliales de individuos en riesgo de presentar DM2, evidencias que sugieren reconsiderar la importancia de la HFDM2.

Como ya se menciona, la síntesis del ON depende del transporte de la glucosa por el transportador GLUT1. Asimismo, se ha detallado el papel de p53 con la proliferación y la apoptosis de la célula endotelial, pero además, como regulador de la respiración mitocondrial y de la expresión de GLUT1 en presencia de concentraciones elevadas de glucosa. Es relevante mencionar, que se ha demostrado que p53 es además un regulador de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en otros tipos celulares. Por estas razones en este trabajo consideramos importante evaluar la expresión de los transcritos para eNOS, GLUT1 y p53. Los resultados de este trabajo, muestran una mayor expresión del transcrito de eNOS en las células de los niños control, lo cual estuvo asociado con una mayor concentración de metabolitos derivados del ON en el medio de cultivo. En contraste en las HUVECs de los niños con HFDM2 una expresión disminuida de este transcrito estuvo asociada con una menor concentración de metabolitos del ON en el medio de cultivo. En relación a la expresión del transcrito de GLUT1 no encontramos cambios en su expresión en las HUVECs de los niños control, pero se observó una mayor expresión en las

células de los niños con HFDM2. En cuanto a p53 encontramos que su expresión no presento cambios en las HUVECs de los niños control pero nuevamente observamos una disminución en las HUVECs de los niños con HFDM2.

Los diferentes niveles de expresión de eNOS, GLUT1 y p53 observados sugieren varias cosas: 1) que estos tres elementos están asociados con el inicio de la disfunción endotelial, al estar ligados con una mayor susceptibilidad de las HUVECs de niños con HFDM2 al estrés derivado de la elevación en la concentración de glucosa; 2) Que esta susceptibilidad es consecuencia de un metabolismo alterado de la glucosa y de la actividad mitocondrial; 3) que estos 3 elementos podrían funcionar como marcadores tempranos de la disfuncionalidad endotelial en las HUVECs de recién nacidos con HFDM2.

Es importante recordar que los resultados obtenidos en trabajos previos al nuestro acerca de la síntesis de ROS, expresión de la eNOS, así como de la síntesis del ON, muestran variaciones acerca del tiempo de exposición, así como de la concentración de glucosa utilizada. Acerca de esto, es importante mencionar que en ninguno de estos trabajos, fue un factor a considerar la HFDM2. Asimismo, en muchos de estos trabajos se utilizaron “pools” de HUVECs obtenidas de distintos cordones umbilicales. De acuerdo con resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, así como de otros autores, este tipo de cultivo empleando células endoteliales de diferentes orígenes, induce por sí mismo la síntesis de ON, razón por la cual nosotros descartamos su utilización. Por esta razón, podemos sugerir que esto explica las diferencias encontradas al comparar otros trabajos con el nuestro.

Nuestro trabajo presenta algunas limitaciones como lo es, el número de muestras evaluadas, esto fue consecuencia de:

1) De la dificultad para encontrar mujeres embarazadas con las características necesarias; 2) de la dificultad para que las HUVECs provenientes de recién nacidos con HFDM2 crecieran en cultivo, ya que una característica de estas células es la lentitud de su proliferación; 3) de la dificultad para poder lograr tener el número de células necesarios para realizar las repeticiones de los experimentos y 4) la presencia de obesidad solo en las madres de los niños con HFDM2 evaluados en nuestro trabajo.

Sin embargo, a pesar de estas dificultades, consideramos que la utilización de cultivos procedentes de un solo cordón umbilical nos permite soportar la validez de nuestros resultados y sugerir que la HFDM2 está asociada con alteraciones en el metabolismo de la glucosa, así como con una deficiente actividad de sus mitocondrias, lo cual limita la síntesis de dos importantes reguladores de la célula endotelial. En relación a la presencia de obesidad como un factor adicional de riesgo para el recién nacido, se ha reportado que esta es considerada como un factor de riesgo para presentar preclampsia (104), daño vascular en la madre (105), así como estar en un estado de inflamación subclínico (106). Sin embargo, consideramos que la ausencia de datos que indicaran la presencia de diabetes gestacional, preclampsia o el nacimiento de productos macrosómicos disminuye el riesgo de que nuestros resultados deriven de la exposición de la célula endotelial durante la gestación a la elevación de citocinas o de la concentración de glucosa. Asimismo, es importante recordar que nuestros resultados fueron obtenidos después de mantener en cultivo por varios pases a las células endoteliales

obtenidas de los niños con y sin HFMD2, antes de incubarlas en concentraciones suprafisiológicas de glucosa. Esto consideramos reduce el riesgo de que su exposición previa a algún agente capaz de alterar su funcionalidad este asociada con el efecto observado.

En conclusión, nuestros resultados nos permiten sugerir que el origen de la disfunción endotelial temprana que se ha observado en los individuos con HFDM2, es consecuencia de la disminuida síntesis de ROS y de ON.

## **Capítulo VII. Conclusiones**

- 1.- La síntesis de ROS y de ON disminuyó en HUVECs de recién nacidos sanos pero con HFDM2.**
- 2.- La actividad mitocondrial disminuyó en las HUVECs obtenidas de recién nacidos sanos pero con HFDM2, incubadas en concentraciones suprafisiológicas de glucosa (>5mM/L).**
- 3.- La síntesis de ROS en las HUVECs es principalmente mitocondrial y está asociada de manera muy importante con el metabolismo de la glucosa.**
- 4.- La síntesis disminuida de ON se explica por la disminución en la expresión del transcrito de eNOS en condiciones de estrés derivados de la concentración suprafisiológica de glucosa**
- 5.- Nuestros resultados sugieren que la HFDM2 se puede asociar con la disfunción endotelial temprana por la deficiente síntesis de ROS y de ON.**

## **Capítulo VIII. Perspectivas**

- 1.- Corroborar la asociación encontrada (eNOS, GLUT1 y p53) en este trabajo, en un mayor número de HUVECs obtenidas de niños clínicamente sanos con y sin HFDM2
- 2.- Evaluar la posible utilidad de estos marcadores (eNOS, GLUT1 y p53), en células de fácil obtención (linfocitos, por ejemplo), de individuos con y sin HFDM2.
- 3.- Derivado del papel importante que juega p53, en diferentes vías del metabolismo celular (descrito esto recientemente), evaluar su utilidad como un posible marcador temprano de la enfermedad.
- 4.- Determinar el papel del ON sintetizado en mitocondria, como un evento temprano en la disfuncionalidad endotelial.
- 5.- Evaluar indirectamente la actividad de la célula endotelial, comparando los niveles de glucosa y la presencia de metabolitos derivados del ON o marcadores de la presencia de ROS (malondialdehído por ejemplo), en el plasma de individuos con HFDM2.

## Capítulo IX. Referencias:

- 1.- Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002; 25(Suppl 1): S5-S20
- 2.- Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1994; 331: 1428-36
- 3.- Feng Y, vom Hagen F, Lin J, Hammes HP. Incipient diabetic retinopathy--insights from an experimental model. *Ophthalmologica* 2007; 221: 269-74.
- 4.- Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, Okuda S. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 952-9.
- 5.- Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AAF. Diabetic neuropathy-a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16: 408-433
- 6.- Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 221-29
- 7.- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay R, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med* 1994; 11: 299-303
- 8.- Svensson M, Nystrom L, Schon S, Dahlquist G. Age at onset of childhood-onset type 1 diabetes and the development of end-stage renal disease: a nationwide population-based study. *Diabetes Care* 2006; 29: 538-42.
- 9.- Michael R, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. *BPR Clin Endocrinol Metabolism* 2003; 17: 365-383
- 10.- Takaike H, Uchigata Y, Iwasaki N, Iwamoto Y. Transient elevation of liver transaminase after starting insulin therapy for diabetic ketosis or ketoacidosis in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 64: 27-32
- 11.- Ferrannini E, Muscelli E, Natali A, Gabriel R, Mitrakou A, Flyvbjerg A, Golay A, Hojlund K. Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Disease Risk (RISC) Project Investigators. Association of fasting glucagon and

- proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia* 2007; 50: 2342-7.
- 12.- Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ. The Acapulco Declaration: a proposal to reduce incidence of diabetes in Mexico. *Rev Invest Clin* 2006; 58: 71-7.
  - 13.- Meaney E, Lara-Esqueda A, Ceballos-Reyes GM, Asbun J, Vela A, Martínez-Marroquín Y, López V, Meaney A, de la Cabada-Tamez E, Velázquez-Monroy O, Tapia-Conyer R. Cardiovascular risk factors in the urban Mexican population: the FRIMEX study. *Public Health* 2007; 121: 378-84.
  - 14.- Ginsberg NH. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 453–458
  - 15.- Chang AS, Kim SH, Yoon HK, Ko HS, Kwon SH, Kim RS, *et al.* Body mass index is the most important determining factor for the degree of insulin resistance in non-obese type 2 diabetic patients in Korea. *Metabolism* 2004; 53: 142-46
  - 16.- Cruz M, Torres M, Aguilar-Herrera B, Perez-Johnston R, Guzman-Juarez N, Aranda M, Kumate J. Type 2 diabetes mellitus in children--an increasing health problem in Mexico. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 17: 183-90.
  - 17.- Kruijshoop M, Feskens MJE, Blaak EE, de Bruin AWT. Validation of capillary glucose measurements to detect glucose intolerance or type 2 diabetes mellitus in the general population. *Clin Chim Acta* 2004; 341: 33-40
  - 18.- Rodriguez-Ventura AL, Yamamoto-Furusho JK, Coyote N, Dorantes LM, Ruiz-Morales JA, Vargas-Alarcon G, Granados J. HLA-DRB1\*08 allele may help to distinguish between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus in Mexican children. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 5-10.
  - 19.- Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shriver M, Wachter N, Kumate J, Kittles R, Cruz M. Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet* 2007; 71: 359-66.
  - 20.- Wändell EP, Gåfvels C. Patients with type 2 diabetes aged 35–64 years at four primary health care centres in Stockholm County, Sweden: Prevalence

- and complications in relation to gender and socio-economic status. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 63: 195-203
- 21.- Selvin E, Coresh J, Brancati FL. The burden and treatment of diabetes in elderly individuals in the U.S. *Diabetes Care* 2006; 29: 2415-9.
  - 22.- Martin S, Schramm W, Schneider B, Neeser K, Weber C, Ludwig V, Heinemann L, Scherbaum WA, Kolb H. Epidemiology of Complications and Total Treatment Costs from Diagnosis of Type 2 Diabetes in Germany (ROSSO 4). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115: 495-501.
  - 23.- Partida-Hernández G, Arreola F, Fenton B, Cabeza M, Roman-Ramos R, Revilla-Monsalve MC. Effect of zinc replacement on lipids and lipoproteins in type 2-diabetic patients. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 161-8.
  - 24.- Shargorodsky M, Wainstein G, Gavish E, Leibovitz Z, Matas D, Zimlichman R. Treatment with rosiglitazone reduces hyperinsulinemia and improves arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2003; 16: 617-22.
  - 25.- Gredal C, Rosenfalck AM, Dejgaard A, Hilsted J. Impaired first-phase insulin response predicts postprandial blood glucose increment in patients with recently diagnosed type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 327-36.
  - 26.- Kohler IV, Soldo BJ. Childhood predictors of late-life diabetes: the case of Mexico. *Soc Biol* 2005 Fall-Winter; 52: 112-31.
  - 27.- Green AJ, Bazata DD, Fox KM, Grandy S; for the SHIELD Study Group. Health-related behaviours of people with diabetes and those with cardiometabolic risk factors: results from SHIELD. *Int J Clin Pract* 2007; 61: 1791-7.
  - 28.- Curtis J, Wilson C. Preventing type 2 diabetes mellitus. *J Am Board Fam Pract* 2005; 18: 37-43.
  - 29.- Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30 Suppl 2: S134-40.

- 30(69).- García-García E, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna T, Rull-Rodrigo JA. Early-onset type 2 diabetes in Mexico. *Isr Med Assoc J* 2002; 4: 444-8.
- 31(70).- Doria A, Yang Y, Malecki M, Scotti S, Dreyfus J, O'Keeffe C, *et al.* Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes. *Diabetes Care* 1999; 22: 253-61.
- 32.- Goran MI, Bergman RN, Avila Q, Watkins M, Ball GD, Shaibi GQ, Weigensberg MJ, Cruz ML. Impaired glucose tolerance and reduced beta-cell function in overweight Latino children with a positive family history for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 207-12.
- 33.- Beck-Nielsen H, Vaag A, Poulsen P, Gaster M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects--experiences from relatives and twin studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 445-67.
- 34.- Williams MA, Qiu C, Dempsey JC, Luthy DA. Familial aggregation of type 2 diabetes and chronic hypertension in women with gestational diabetes mellitus. *J Reprod Med* 2003; 48: 955-62.
- 35.- Hansen L. Candidate genes and late-onset type 2 diabetes mellitus. Susceptibility genes or common polymorphisms? *Dan Med Bull* 2003; 50: 320-46.
36. Gill-Carey O, Hattersley AT. Genetics and type 2 diabetes in youth. *Pediatr Diabetes* 2007; 8 Suppl 9: 42-7.
- 37.- Chang SG, Choi KD, Jang SH, Shin HC. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin. *Mol Cells* 2003; 16: 323-30.
- 38.- Wang ZH, Liu Y, Ji JG, Tang JG. Effects of deletion and shift of the a20-b19 disulfide bond on the structure, activity, and refolding of proinsulin. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 135: 25-31.
- 39.- Tarnow L, Grarup N, Hansen T, Parving HH, Pedersen O. Diabetic microvascular complications are not associated with two polymorphisms in the GLUT-1 and PC-1 genes regulating glucose metabolism in Caucasian type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1653-56.

- 40.- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, *et al.* Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 2000; 6: 924-28.
- 41.- Maassen JA. Mitochondrial diabetes, diabetes and the thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome and MODY-2. Diseases with common pathophysiology? *Panminerva Med* 2002; 44: 295-300.
- 42.- Cuesta-Munoz AL, Huopio H, Otonkoski T, Gomez-Zumaquero JM, Nanto-Salonen K, Rahier J, *et al.* Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 2004; 53: 2164-8.
- 43.- Stern MP. The search for type 2 diabetes susceptibility genes using whole-genome scans: an epidemiologist's perspective. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18: 106-13.
- 44.- Boileau P, Wolfrum C, Shih DQ, Yang TA, Wolkoff AW, Stoffel M. Decreased glibenclamide uptake in hepatocytes of hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice: a mechanism for hypersensitivity to sulfonylurea therapy in patients with maturity-onset diabetes of the young, type 3 (MODY3). *Diabetes* 2002; 51 (Suppl 3): S343-48.
- 45.- Suzuki Y, Taniyama M, Muramatsu T, Ohta S, Murata C, Atsumi Y, Matsuoka K. Mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation at position 3243 and symptomatic polyneuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1315-6
- 46.- Choo-Kang AT, Lynn S, Taylor GA, Daly ME, Sihota SS, Wardell TM, *et al.* Defining the importance of mitochondrial gene defects in maternally inherited diabetes by sequencing the entire mitochondrial genome. *Diabetes* 2002; 51: 2317-20.
- 47.- Salles JE, Moises VA, Almeida DR, Chacra AR, Moises RS. Myocardial dysfunction in mitochondrial diabetes treated with Coenzyme Q10. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 72: 100-3.
- 48.- Shiota D, Kasamatsu T, Dib SA, Chacra AR, Moises RS. Role of the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene in Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. *Pancreas* 2002; 24: 386-90.

- 49.- Gragnoli C, Milord E, Habener JF. Linkage study of the glucagon receptor gene with type 2 diabetes mellitus in Italians. *Metabolism* 2005; 54: 786-7.
- 50.- : Motoyama K, Emoto M, Tahara H, Komatsu M, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y. Association of muscle glycogen synthase polymorphism with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2003; 52: 895-99.
- 51.- Study group for the Identification of type 2 diabetes genes in Japanese. The Met416-->Val variant in the glycogen synthase gene: the prevalence and the association with diabetes in a large number of Japanese individuals. *Diabetes Care* 2000; 23: 1709-10.
- 52.- Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou JP, Vidal H. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 1134-42.
- 53.- Meugnier E, Faraj M, Rome S, Beauregard G, Michaut A, Pelloux V, *et al.* Acute hyperglycemia induces a global downregulation of gene expression in adipose tissue and skeletal muscle of healthy subjects. *Diabetes* 2007; 56: 992-9.
- 54.- Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, *et al.* Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4531-6.
- 55.- Pratipanawatr T, Cusi K, Ngo P, Pratipanawatr W, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Normalization of plasma glucose concentration by insulin therapy improves insulin-stimulated glycogen synthesis in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 462-28.
- 56.- Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, *et al.* Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med* 2006; 12: 425-32.
- 57.- Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084: 89-117.

- 58.- Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 (Suppl 3): S53-S55.
- 59.- Schwarzenberg SJ, Sinaiko AR. Obesity and inflammation in children. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7: 239-46.
- 60.- [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/#](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/#)
- 61.- Colagiuri S, Borch-Johnsen K, Glümer C, Vistisen D. There really is an epidemic of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 1459-63.
- 62.- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-7.
- 63.- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, *et al.* Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 2011; 378: 31-40.
- 64.- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 4-14.
- 65.- Dowse GK, Gareeboo H, Zimmet PZ, Alberti KG, Tuomilehto J, Fareed D, *et al.* High prevalence of NIDDM and impaired glucose tolerance in Indian, Creole, and Chinese Mauritians. Mauritius Noncommunicable Disease Study Group. *Diabetes* 1990; 39: 390-6.
- 66.- SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, Liese AD, D'Agostino RB Jr, Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, *et al.* The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics* 2006; 118: 1510-8.
- 67.- Dabelea D, Dolan LM, D'Agostino R Jr, Hernandez AM, McAteer JB, Hamman RF, *et al.* Association testing of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in multi-ethnic youth. *Diabetologia* 2011; 54: 535-9.
- 68.- Li C, Ford ES, Zhao G, Mokdad AH. Prevalence of pre-diabetes and its association with clustering of cardiometabolic risk factors and hyperinsulinemia

- among U.S. adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Diabetes Care* 2009; 32: 342-7.
- 69.- Olaiz-Fernández G, Rojas R, Aguilar-Salinas CA, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus in Mexican adults: results from the 2000 National Health Survey. *Salud Publica Mex* 2007; 49: S331-S337.
- 70.- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B, *et al.* Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Publica Mex.* 2010; 52 Suppl 1: S19-26.
- 71.- Meur G, Simon A, Harun N, Virally M, Dechaume A, Bonnefond A, *et al.* Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention. *Diabetes* 2010; 59: 653-61.
- 72.- Hernández-Alvarez MI, Thabit H, Burns N, Shah S, Brema I, Hatunic M, *et al.* Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1{alpha}/Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care* 2010; 33: 645-51.
- 73.- Irving R, Tusié-Luna MT, Mills J, Wright-Pascoe R, McLaughlin W, Aguilar-Salinas CA. Early onset type 2 diabetes in Jamaica and in Mexico. Opportunities derived from an interethnic study. *Rev Invest Clin* 2011; 63: 198-209.
- 74.- Taub PR, Ramirez-Sanchez I, Ciaraldi TP, Perkins G, Murphy AN, Naviaux R, *et al.* Alterations in skeletal muscle indicators of mitochondrial structure and biogenesis in patients with type 2 diabetes and heart failure: effects of epicatechin rich cocoa. *Clin Transl Sci* 2012; 5: 43-7.
- 75.- Hoeks J, Schrauwen P. Muscle mitochondria and insulin resistance: a human perspective. *Trends Endocrinol Metab* 2012 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22726362.
- 76.- Gordon AP. Effects of diabetes on the vascular system: current research evidence and best practice recommendations. *J Vasc Nurs* 2004; 22: 2-11

- 78.- Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, *et al.* Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1342-7.
- 79.- Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg* 2006; 61: 213-9.
- 80.- Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008; 19: 9-23.
- 81.- Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995; 16: 449-57.
- 82.- Csiszar A, Lehoux S, Ungvari Z. Hemodynamic forces, vascular oxidative stress, and regulation of BMP-2/4 expression. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 1683-97.
- 83.- Kibria G, Heath D, Smith P, Biggar R. Pulmonary endothelial pavement patterns. *Thorax* 1980; 35: 186-91.
- 84.- Cicha I, Goppelt-Struebe M, Yilmaz A, Daniel WG, Garlich CD. Endothelial dysfunction and monocyte recruitment in cells exposed to non-uniform shear stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008; 39: 113-9.
- 85.- Hueck IS, Rossiter K, Artmann GM, Schmid-Schönbein GW. Fluid shear attenuates endothelial pseudopodia formation into the capillary lumen. *Microcirculation* 2008; 15: 531-42.
- 86.- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100: 158-73.
- 87.- Muro S, Koval M, Muzykantov V. Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2: 281-99.
- 88.- Lopez-Garcia E, Hu FB. Nutrition and the endothelium. *Curr Diab Rep* 2004; 4: 253-9.
- 89.- Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 713-38.

- 90.- Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; 202: 330-44.
- 91.- Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med* 2011 Sep 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21895549.
- 92: Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 894-912.
- 93.- Drechsel DA, Estévez AG, Barbeito L, Beckman JS. Nitric Oxide-Mediated Oxidative Damage and the Progressive Demise of Motor Neurons in ALS. *Neurotox Res* 2012 Apr 10. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22488161.
- 94.- Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun* 2012 Jul 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22825450.
- 95.- Cau SB, Carneiro FS, Tostes RC. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Front Physiol* 2012; 3: 218.
- 96.- Yu J, Zhang Y, Zhang X, Rudic RD, Bauer PM, Altieri DC, Sessa WC. Endothelium derived nitric oxide synthase negatively regulates the PDGF-survivin pathway during flow-dependent vascular remodeling. *PLoS One* 2012; 7: e31495.
- 97.- Watt J, Ewart MA, Greig FH, Oldroyd KG, Wadsworth RM, Kennedy S. The effect of reactive oxygen species on whole blood aggregation and the endothelial cell-platelet interaction in patients with coronary heart disease. *Thromb Res* 2012 Apr 18. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22520023.
- 98.- Kotb NA, Gaber R, Salah W, Elhendy A. Relations among Glycemic Control, Circulating Endothelial Cells, Nitric Oxide, and Flow Mediated Dilation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012 May 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22639396.
- 99.- Li H, Isomaa B, Taskinen MR, Groop L, Tuomi T. Consequences of a family history of type 1 and type 2 diabetes on the phenotype of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 589-94.

- 100.- Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, Devlin H, Hurley S, Varo N, *et al.* Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 2456-61.
- 101.- Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, *et al.* Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1856-62.
- 102.- Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 2002; 9: 231-8.
- 103.- Lemkes BA, Nieuwdorp M, Hoekstra JB, Holleman F. The glycocalyx and cardiovascular disease in diabetes: should we judge the endothelium by its cover? *Diabetes Technol Ther* 2012; 14 Suppl 1:S3-10.
- 104.- López-Carbajal MJ, Manríquez-Moreno ME, Gálvez-Camargo D, Ramírez-Jiménez E. [Risk factors associated to preclampsia]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2012; 50: 471-6.
- 105.- Denedy MC, Avalos G, O'Reilly MW, O'Sullivan EP, Dunne FP. The impact of maternal obesity on gestational outcomes. *Ir Med J* 2012; 105 (5 Suppl): 23-5.
- 106.- Bartha JL, Fernández-Deudero A, Bugatto F, Fajardo-Exposito MA, González-González N, Hervías-Vivancos B. Inflammation and cardiovascular risk in women with preterm labor. *J Womens Health (Larchmt)* 2012; 21: 643-8
- 107.- Instituto Nacional de Salud Pública. Resultados Nacionales. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Consulta en línea 22 de enero de 2013: [http://ensanut.insp.mx/doctos/FactSheet\\_ResultadosNacionales14Nov.pdf](http://ensanut.insp.mx/doctos/FactSheet_ResultadosNacionales14Nov.pdf)

## **Anexo A. Artículos y Congresos**

El total de artículos y congresos en donde se presentaron los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, se muestran a continuación:

### **Artículos:**

1: **Alvarado-Vásquez N**, Páez A, Zapata E, Alcázar-Leyva S, Zenteno E, Massó F, Montaña LF. HUVECs from newborns with a strong family history of diabetes show diminished ROS synthesis in the presence of high glucose concentrations. **Diabetes Metab Res Rev** 2007; 23(1):71-80.

2: **Alvarado-Vásquez N**, Zapata E, Alcázar-Leyva S, Massó F, Montaña LF. Reduced NO synthesis and eNOS mRNA expression in endothelial cells from newborns with a strong family history of type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev** 2007; 23(7):559-66.

### **Congresos:**

1.- **Alvarado N**, Zapata E, Alcazar S, Masso F, Montaña L.F. ENDOTHELIAL CELLS ISOLATED FROM NEWBORNS WITH A FAMILY HISTORY OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS SHOW REDUCED SYNTHESIS OF NO AND ROS, AND DIMINISHED METABOLIC AND CELLULAR ACTIVITY; en el 20th WORLD DIABETES CONGRESS en el año 2009, Barcelona, España.

2.- **Alvarado-Vásquez N**, Zapata E, Massó F, et al. ENDOTHELIAL CELLS FROM NEWBORNS WITH A STRONG FAMILY HISTORY OF TYPE 2 DIABETES SHOWED A DEFICIENT SYNTHESIS OF NO AND ROS IN HIGH GLUCOSE CONCENTRATIONS; en el 2nd INTERNATIONAL CONGRESS ON "PREDIABETES" en el año 2007, Canada.

3.- **Alvarado-Vásquez N**. DISMINUCIÓN DE LA SÍNTESIS DE ROS EN CELULAS ENDOTELIALES DE R/N CON ANTECEDENTES FAMILIARES DE

DIABETES MELLITUS TIPO 2; en el XXV Coloquio de Investigación de la FES Iztacala en el año 2006, México.

4.- **Alvarado VN**, Paez A, Zapata E, et al. LA SINTESIS DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO ESTA LIMITADA EN CELULAS ENDOTELIALES DE CORDON UMBILICAL HUMANO CON ANTECEDENTES FAMILIARES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2; en el XIV CONGRESO DE BIOENERGETICA Y BIOMEMBRANAS en el año 2005, Oaxaca, México.

5.- **Alvarado-Vásquez N**, López-Marure R, Masso F, et. al. GLUCOSE CONSUMPTION AND NITRIC OXIDE SYNTHESIS IN HUVECS FROM NEWBORNS WITH AND WITHOUT DIABETIC MOTHERS INCUBATED WITH SUPRAPHYSIOLOGICAL GLUCOSE CONCENTRATIONS; en el SECOND WORLD CONGRESS ON FETAL ORIGINS OF ADULT DISEASE en el año 2003, en el Reino Unido.

## **Anexo B**

Cuestionario aplicado a cada una de las madres evaluadas

Fecha (mes/día/año)\_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento:\_\_\_\_\_ Edad:\_\_\_\_\_

Escolaridad: \_\_\_\_\_

¿Actualmente se encuentra sana?: Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

¿El médico le ha diagnosticado alguna enfermedad?: Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

En caso de ser positiva la RESPUESTA ANTERIOR especifique la enfermedad:

\_\_\_\_\_

### **Antecedentes familiares**

¿Sus dos padres viven?: Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

En caso de que la respuesta anterior sea no:

¿Quién falleció? \_\_\_\_\_ y de que causa \_\_\_\_\_

¿En su familia alguien murió, enfermó o se encuentra enfermo? (Anotar el número de la enfermedad(es) correspondientes al familiar afectado).

1- Presión arterial alta

Papá:

2- Embolia cerebral

Mamá:

3- Ataque cardíaco

Abuelo Paterno:

4- Obesidad

Abuela Paterna:

5- Diabetes

Abuelo Materno:

6- Colesterol alto

Abuela Materna:

7- Ácido úrico

Tíos Paternos:

8- Enfermedad del riñón

Tíos Maternos:

9- Cáncer

Especifique en dónde:



6- Ve luces (fosfenos) Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

7- Zumbido de oídos Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

8- Mareos o vahídos Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

9- Dificultad para caminar (claudicación) Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

10- Várices Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

11- Otro \_\_\_\_\_

### **Exploración física**

Peso:            kg

Talla:            cm

Perímetro de cintura:

Perímetro de cadera:

Tensión arterial:

Datos del recién nacido:

Peso:            kg

Talla:            cm

Tiempo de gestación:            semanas