



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTOS DE LA GLICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD SOBRE LA
DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES ENDOTELIALES Y SU RELACIÓN CON EL
ESTADO FUNCIONAL DEL TEJIDO ADIPOSO EN LAS ETAPAS DE PREDIABETES Y
DIABETES TIPO 2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MAESTRO EN CIENCIAS

JORGE GALARZA ESTEBAN

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

COMITÉ TUTOR: DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.
DR. SAMUEL CANIZALEZ QUINTEROS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTOS DE LA GLICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD SOBRE LA
DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES ENDOTELIALES Y SU RELACIÓN CON EL
ESTADO FUNCIONAL DEL TEJIDO ADIPOSO EN LAS ETAPAS DE PREDIABETES Y
DIABETES TIPO 2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MAESTRO EN CIENCIAS

JORGE GALARZA ESTEBAN

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

**COMITÉ TUTOR: DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.
DR. SAMUEL CANIZALEZ QUINTEROS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO, 2024.



COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0278/2024
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **19 de febrero de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **JORGE GALARZA ESTEBAN** con número de cuenta **98555150** con la tesis titulada **"EFECTOS DE LA GLICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES ENDOTELIALES Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO FUNCIONAL DEL TEJIDO ADIPOSO EN LAS ETAPAS DE PREDIABETES Y DIABETES TIPO 2"**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Vocal: DR. IVÁN TORRE VILLALVAZO
Vocal: DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ
Vocal: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Secretario: DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 08 de abril de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/RCHT/EARR/rcht

Agradecimientos Institucionales.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo recibido durante la realización de mi tesis. La excelencia académica de la institución ha sido fundamentales para mi crecimiento académico y profesional. Aprecio profundamente la guía de mis mentores, los Doctores Luis Felipe Montaña Estrada, Oscar Armando Pérez Méndez, y Samuel Canizales Quinteros, por su apoyo y sus enseñanzas.

A mi amada esposa, a mis padres y a mis queridos hermanos, quienes me han brindado su apoyo incondicional.

Deseo agradecer a mis compañeros, investigadores y, estudiante que apoyaron este trabajo, especialmente al Dr. Felipe Massó Rojas cuyo apoyo ha sido fundamental para lograr este objetivo. También, quiero agradecer al Instituto Nacional de Cardiología por el apoyo brindado.

Finalmente, a los participantes del estudio, por atender este protocolo de investigación.

¡Mil gracias por todo!

Índice

Abreviaturas

1. Resumen.	1
2. Abstract	3
3. Introducción.	5
3.1 Regulación fisiológica de la glucosa.	5
3.2. Metabolismo de las HDLs.	13
3.3 Diabetes mellitus.	17
4. Planteamiento del problema.	34
5. Justificación.	36
6. Preguntas de Investigación.	37
7. Hipótesis.	37
8. Objetivos.	38
9. Metodología.	39
10. Resultados.	45
10.1 Características clínicas de la población estudiada.	45
10.2 Caracterización de las HDL de los grupos de estudio.	45

10.3 Marcadores séricos de disfunción del tejido adiposo.	48
10.4 Asociación de las características de HDLs con marcadores	50
de disfunción del tejido adiposo.	
10.5 Aislamiento y caracterización de las células.	54
multipotenciales derivadas de monocitos.	
10.6 Efecto de las HDL sobre la diferenciación de las células.	56
multipotenciales derivadas de monocitos a fenotipo endotelial	
11. Discusión.	59
11.1 HDLs y marcadores de función del tejido adiposo.	60
11.2 HDLs y función vascular en la diabetes tipo 2	63
11.3 Fortalezas y limitaciones.	66
12. Conclusiones.	68
13. Referencias bibliográficas.	70
14. Anexo I. Artículo requisito para la obtención del grado.	87
15. Anexo II. Artículo enviado.	95

Abreviaturas.

Algunas abreviaturas son mostradas empleando sus siglas en ingles.

AGEs: Productos finales de glicación avanzada.

ApoA1: apolipoproteína A1.

ApoB-100: Apolipoproteína B-100.

ANOVA: Análisis de varianza.

ATIR: Resistencia a la insulina del tejido adiposo.

CETP: proteína transportadora de esteres de colesterol.

C-HDL: Colesterol de HDL.

C-LDL: colesterol de LDL.

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial.

GLP-1: Péptido similar al glucagón 1.

HDLs: Lipoproteínas de alta densidad.

HbA1C: hemoglobina glicada.

HL: Lipasa hepática.

HOMA-IR: Modelo homeostático de resistencia a la insulina.

HUVEC: Células endoteliales de cordón umbilical humano.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1.

Interleucina: IL.

IRS: Sustrato del receptor de insulina.

KDR: Receptor de dominio de inserción de kinasa (VEGF).

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LPL: Lipasa lipoproteica.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1.

SGLT-2: Cotransportador de sodio/glucosa 2.

TGRL: Lipoproteínas ricas en triglicéridos.

TNF- alfa: Factor de necrosis tumoral alfa.

TNF-beta: Factor de necrosis tumoral beta.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1.

VEGFR-2: Receptor del factor de crecimiento endotelial 2.

1. Resumen

Antecedentes: Las lipoproteínas de alta densidad (HDLs) son partículas lipídicas pseudomicelares que participan en el transporte reverso del colesterol que además poseen capacidades anti-aterogénicas, anti-oxidantes y vasodilatadoras. Sin embargo, en las etapas tempranas de la diabetes mellitus tipo 2 estas capacidades disminuyen en asociación al incremento en la disfunción del tejido adiposo y el riesgo de enfermedad cardiovascular. En la diabetes tipo 2 también se observa una reducción en la capacidad de diferenciación de células multipotenciales derivadas de monocitos al linaje endotelial. Sin embargo, no se comprende completamente la relación entre las alteraciones estructurales de las HDLs, la capacidad de diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos y el estado funcional del tejido adiposo en las etapas tempranas de la diabetes tipo 2.

Objetivo: Evaluar el efecto de las alteraciones de las características estructurales de las HDLs en la fase temprana de la diabetes tipo 2, como la glicación, composición y tamaño, sobre la capacidad de diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos hacia el fenotipo endotelial y el estado funcional del tejido adiposo.

Métodos: Se aislaron HDLs de individuos normoglucémicos, con glucosa de ayuno alterada (prediabetes) y con diabetes tipo 2 de recién diagnóstico mediante ultracentrifugación secuencial basada en densidad. Se evaluó la glicación temprana e intermedia de las HDLs utilizando métodos bioquímicos estándar y los productos finales de glicación avanzada (AGEs) mediante ELISA competitivo. También, se analizó el tamaño de partícula y la composición macromolecular de las HDLs. Para evaluar el efecto de la modificación de HDLs en la diferenciación endotelial, se aislaron células multipotenciales derivadas de monocitos CD14+ de sangre periférica de voluntarios sanos y se cultivaron en placas recubiertas con fibronectina en presencia de HDLs de los tres grupos. Se evaluaron los marcadores de diferenciación endoteliales CD14, CD34 y KDR mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Se evaluaron también marcadores séricos de disfunción del tejido adiposo (insulina, adiponectina y ácidos grasos libres), el índice de resistencia a

la insulina del tejido adiposo (ATIR) y leptina), e inflamación (inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), y la proteína C reactiva de alta sensibilidad en suero de los tres grupos.

Resultados: Las HDLs de los pacientes con diabetes tipo 2 de recién diagnóstico presentaron mayor glicación temprana en HDLs (2 5,2 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína) en comparación con los individuos con normoglucemia y prediabetes (4,6 y 4,4 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, respectivamente, $p=0.049$). La concentración de AGEs mostró un patrón similar (7,7, 8,7 y 14,3 $\mu\text{g-BSA-AGE/mg}$ de proteína; $p < 0,02$). Aunque el tamaño de las HDLs fue mayor en individuos con normoglucemia y prediabetes (8,51 y 8,44 nm) en comparación con diabetes tipo 2 (8,32 nm, $p < 0,002$), no hubo diferencias en la composición macromolecular de las HDLs entre los grupos. El tamaño y glicación de HDLs se asoció con marcadores de funcionalidad de tejido adiposo como ATIR/adiponectina y el índice ATIR ($\beta = -0,257$, $P = 0,046$ y $\beta = 0,387$, $P = 0,036$, respectivamente). Las HDLs aisladas de personas con diabetes tipo 2 indujeron una mayor expresión de marcadores endoteliales CD14/KDR y CD14/CD34/KDR en las células multipotenciales derivadas de monocitos en comparación con las HDLs de individuos con normoglucemia y prediabetes. Además, se encontró una relación inversa entre la concentración de HDL-AGEs y el número de células CD14/KDR positivas ($r = -0,473$, $p < 0,001$, $n = 52$), de manera más notoria en las HDLs derivadas de individuos con diabetes tipo 2 ($r = -0,606$, $p = 0,009$, $n = 17$).

Conclusión: Las alteraciones estructurales de las HDLs tienen un impacto negativo en la capacidad de diferenciación de células multipotenciales derivadas de monocitos a células endoteliales y en la función del tejido adiposo en personas con diabetes tipo 2 recién diagnosticadas. Estos hallazgos proporcionan una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la progresión de la enfermedad cardiovascular en la diabetes temprana y resalta la importancia de considerar las alteraciones de las HDLs como objetivo terapéutico en el manejo y la prevención de enfermedades cardiovasculares en esta población.

2. Abstract

Background: High-density lipoproteins (HDLs) are pseudomicellar lipid particles that participate in the reverse transport of cholesterol and have antiatherogenic, antioxidant and vasodilatory capacities. However, in the early stages of type 2 diabetes these capacities decrease along with dysfunction of the adipose tissue. A reduction in the differentiation capacity of monocytes-derived multipotential cells from is also observed in type 2 diabetes. However, the relationship between HDLs structural alterations, the differentiation capacity of monocyte-derived multipotential cells, and the functional status of adipose tissue in the early stages of type 2 diabetes is not fully understood.

Objective: To evaluate the effect of alterations in the structural characteristics of HDLs in the early phase of type 2 diabetes, such as glycation, composition, and size, on the differentiation capacity of monocytes-derived multipotential cells towards the endothelial phenotype and the functional state of adipose tissue.

Methods: HDLs were isolated from normoglycemic individuals, with impaired fasting glucose (prediabetes) and with recently diagnosed of type 2 diabetes by sequential density-based ultracentrifugation. Early and intermediate glycation of HDLs were evaluated using standard biochemical methods while advanced glycation end products (AGEs) were evaluated using competitive ELISA. In addition, the particle size and macromolecular composition of HDL were analyzed. To evaluate endothelial differentiation, CD14+ monocyte-derived multipotential cells were isolated from the peripheral blood of blood bank donors and cultured on fibronectin-coated plates in the presence of HDLs from the three groups. The endothelial differentiation markers CD14, CD34 and KDR were evaluated by flow cytometry, using specific monoclonal antibodies. Serum markers of adipose tissue dysfunction (insulin, adiponectin, and free fatty acids), adipose tissue insulin resistance

(ATIR index and leptin), and inflammation (plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and high sensitivity C-reactive protein), were also studied.

Results: The HDLs of patients with recently diagnosed type 2 diabetes presented greater early glycation in HDLs (2.5.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein) compared to individuals with normoglycemia and prediabetes (4.6 and 4.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein, respectively, $p=0.049$). The concentration of AGEs showed a similar pattern (7.7, 8.7 and 14.3 $\mu\text{g-BSA-AGE}/\text{mg}$ of protein; $p < 0.02$). Although the size of HDLs was greater in individuals with normoglycemia and prediabetes (8.51 and 8.44 nm) compared to type 2 diabetes (8.32 nm, $p < 0.002$), there were no differences in the macromolecular composition of the HDLs between groups. HDLs size and glycation were associated with the markers of adipose tissue functionality such as ATIR/adiponectin and the ATIR index ($\beta = -0.257$, $P = 0.046$ and $\beta = 0.387$, $P = 0.036$, respectively). HDLs isolated from individuals with type 2 diabetes induced higher expression of endothelial markers CD14/KDR and CD14/CD34/KDR in monocyte-derived multipotent cells compared to HDLs from individuals with normoglycemia and prediabetes. Furthermore, an inverse relationship was found between the concentration of HDL-AGEs and the number of CD14/KDR positive cells ($r = -0.473$, $p < 0.001$, $n = 52$), most notably in HDLs derived from individuals with type 2 diabetes ($r = -0.606$, $p = 0.009$, $n = 17$).

Conclusion: Structural alterations of HDLs have a negative impact on the differentiation capacity of monocyte-derived multipotential cells from to toward an endothelial phenotype and on the function of adipose tissue in people with type 2 diabetes recently diagnosed. These results provide a greater understanding of the molecular mechanisms involved in the progression of cardiovascular disease in early diabetes and highlights the importance of considering HDLs alterations as a therapeutic target in the management and prevention of cardiovascular diseases in this population.

3. Introducción

3.1.1 Regulación fisiológica de la glucosa.

En condiciones fisiológicas la concentración de glucosa en circulación es mantenida en un rango estrecho con variaciones de acuerdo a la ingesta y demanda de nutrientes. La insulina es el principal regulador del metabolismo de glucosa, en acción concertada con el glucagón, la calcitonina, la serotonina, y la somatostatina. Las actividades de estas hormonas están mediadas por la disponibilidad del nicotin-adenin dinucleótido (NAD⁺), la producción de cuerpos cetónicos y la actividad mitocondrial (1).

Después de la ingestión de alimentos y su primera fase de digestión en el estómago, los nutrientes son finalmente digeridos y absorbidos en el intestino delgado. La entrada de glucosa a circulación produce aumento de las concentraciones plasmáticas de la glucosa (Figura 1).

La regulación fisiológica de la secreción de insulina comprende dos aspectos fundamentales; la respuesta rápida al bolo de glucosa y la secreción pulsátil basal. Cuando la concentración de glucosa se incrementa en circulación por arriba de las 6 mmol/L (108 mg/dL), entra rápidamente en las células beta pancreáticas a través de los transportadores GLUT-1 y GLUT-3. Una vez dentro de las células, la glucosa es fosforilada a glucosa-6 fosfato para entrar a la glucólisis, generando piruvato y equivalentes reductores de NADH. Estos productos ingresan a la mitocondria para sufrir una serie de reacciones en la fosforilación oxidativa y producir ATP. El aumento en concentraciones de ATP afecta los canales de potasio sensibles a ATP, provocando su cierre. Esto despolariza el potencial de membrana, provocando la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje. La rápida entrada de

cationes divalentes de calcio activa los complejos SNAP/SNARE sensibles al calcio que facilitan la fusión de las vesículas que contienen insulina con la membrana plasmática. Esto culmina en la rápida exocitosis de la insulina, conocida como respuesta de primera fase. La insulina almacenada en vesículas de reserva se libera en una segunda fase en respuesta a los secretagogos combustibles y tiene un retraso y un nadir de insulina después de la primera fase (2)

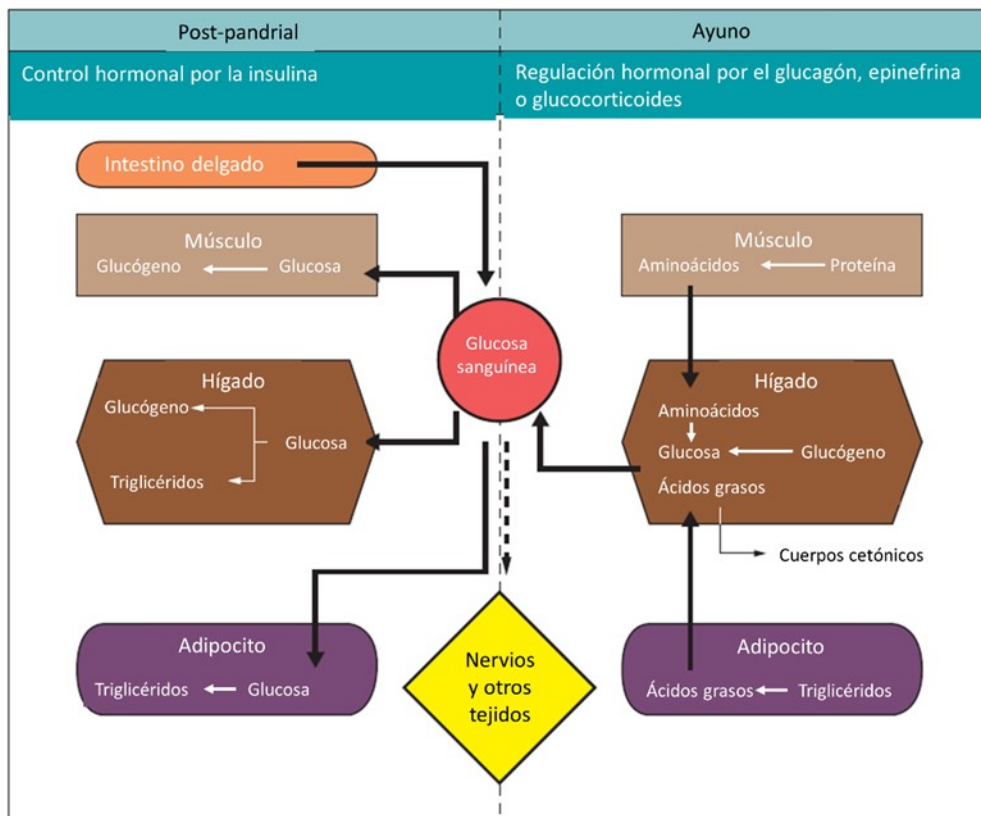


Figura 1. Regulación fisiológica de la concentración de la glucosa. Los tejidos utilizan los sustratos energéticos de manera diferente durante y después del ayuno. La insulina desempeña un papel fundamental al inducir la captación de la glucosa y estimular la síntesis de glucógeno, así como el almacenamiento de triglicéridos en hígado y tejido adiposo. Durante el ayuno, los cuerpos cetónicos son convertidos a glucosa en el hígado para mantener las concentraciones fisiológicas de glucosa. En ayuno prolongado puede iniciar proteólisis del músculo para

proveer más cuerpos cetónicos y ayudar a mantener la glucosa en niveles fisiológicos. Tomado de Holt et al. (3).

3.1.2. Señalización de la insulina en células hepáticas.

El hígado es un órgano central en el metabolismo de glucosa y lípidos. Los efectos de la insulina comienzan con su unión al receptor de insulina en la membrana celular de las células hepáticas (Figura 2). Este receptor está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β (9). La unión de la insulina provoca un cambio conformacional en el receptor, activando la tirosina quinasa en la subunidad β y desencadenando la autofosforilación de residuos de tirosina. Esto a su vez, activa los substratos del receptor de insulina (IRS) IRS-1 e IRS-2, los cuales activan dos vías principales de señalización: la vía del fosfatidilinositol 3-fosfato quinasa/ proteína quinasa B (PI3K/AKT) y la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La vía PI3K/AKT es esencial para la regulación del metabolismo y la proliferación celular. La fosforilación de PI3K conduce a la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), lo que recluta a la proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol-1 (PDK-1), una quinasa de serina/treonina que contribuye a la formación del complejo del blanco de rapamicina 2 (mTORC2). PDK1 activa AKT al fosforilarla en el residuo de treonina en la posición 308. La activación completa de AKT también requiere la fosforilación en el residuo de serina en la posición 473, que puede ser realizada por mTORC2. AKT fosforila a FoxO, lo que reduce su actividad transcripcional y disminuye la gluconeogénesis. Además, AKT regula negativamente a la quinasa glucógeno sintasa 3 β (GSK3 β) mediante fosforilación. Esta acción inactiva a AS160, facilitando la

traslocación de receptor GLUT4 a la membrana celular y aumentando así la captación de glucosa (2)

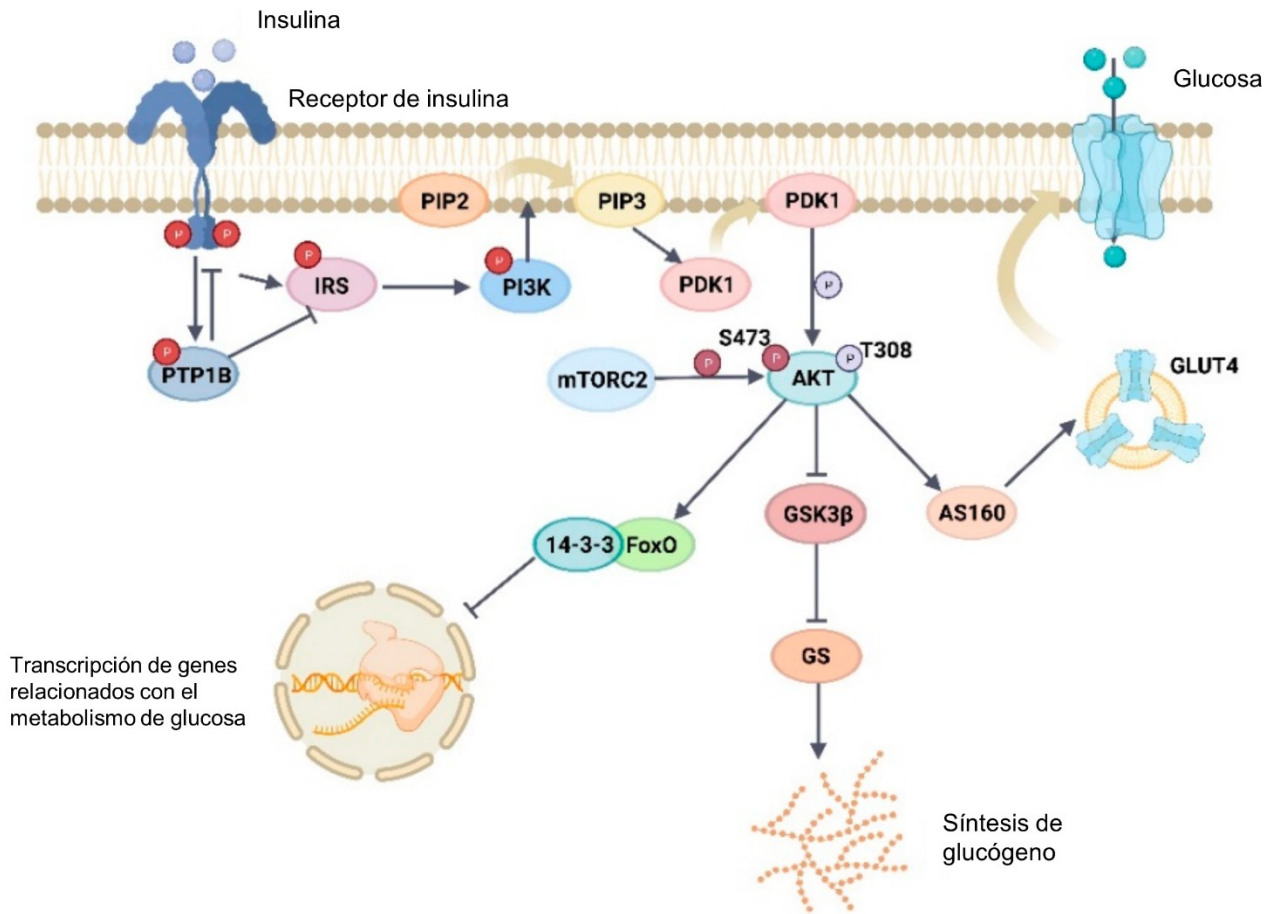


Figura 2. Mecanismo de señalización de la insulina mediado por la vía de quinasas PI3K/AKT. IRS: substratos del receptor de insulina; PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PI3K: fosfatidilinositol 3-fosfato kinasa; mTORC2; complejo del blanco de rapamicina 2.

3.1.3 Regulación del metabolismo hepático por la insulina.

Mediante el mecanismo anterior, la insulina regula el metabolismo hepático para mantener la homeostasis de la glucosa y contribuir a la tolerancia normal a la glucosa. La insulina suprime la producción hepática de la glucosa, inhibiendo la glucogenólisis y la

gluconeogénesis (Figura 1). Además, aumenta la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno hepático y junto con la glucosa, estimula la glucólisis para generar piruvato y emplearlo en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (4). La glucosa postprandial se almacena en forma de glucógeno en el hígado y músculo, y como triglicéridos en el tejido adiposo, sirviendo como reserva para los periodos de ayuno. Se estima que aproximadamente un 25-35 % de la carga enteral de glucosa es captado por el hígado, un 5-10% en el tejido adiposo blanco, un 27-40% por músculo esquelético y 25% por el cerebro. (3,4).

El aumento la disponibilidad de sustratos y el incremento de expresión de la proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides-1 (SREBP-1) promueven la lipogénesis de novo, ayudando a almacenar los ácidos grasos libres externos en triglicéridos (11).

3.1.4 Efectos de la insulina en tejido adiposo blanco.

La captación de glucosa en el tejido adiposo blanco depende en gran medida de la insulina y está regulada por vías similares a las del músculo esquelético (Figura 1). Aunque representa entre el 5% y el 10% de la captación total de glucosa en el cuerpo, su contribución a la glucosa posprandial es relativamente menor en comparación con el músculo esquelético y el hígado. Además, la insulina suprime la lipólisis de los triglicéridos al inhibir la lipasa sensible a hormonas (5).

Los lípidos constituyen una segunda fuente importante de combustible. Los lípidos dietéticos ingresan a la circulación sistémica en forma de quilomicrones y son rápidamente hidrolizados por la actividad de la lipasa lipoproteica (LPL) liberando ácidos grasos libres. La insulina

regula el proceso de captura de los ácidos grasos libres en el tejido adiposo al aumentar la expresión de la LPL. La supresión de la lipólisis en tejido adiposo ayuda a reducir el suministro de ácidos grasos libres al hígado (Figura 1), lo que regula la gluconeogénesis de manera indirecta (5).

3.1.5 Efectos de la insulina sobre el músculo esquelético.

La síntesis del glucógeno muscular, que representa la mayor parte de la eliminación de la glucosa posprandial, se ve significativamente influenciada por la acción de la insulina. Al igual que en el hígado, la insulina activa la vía PI3K/AKT en el músculo esquelético. La activación de AKT conduce a la fosforilación e inactivación de las GTPasas Rab, AS160 y su homólogo TBC1D1, lo que aumenta el tráfico de las vesículas que contienen el transportador GLUT4 hacia la membrana celular. Esto facilita la entrada de glucosa a los miocitos, donde puede destinarse a glucólisis o a síntesis del glucógeno. Para regular la glucólisis, la insulina induce la transcripción de la hexocinasa II, que es la isoforma primaria en músculo esquelético de la primera enzima de la glucólisis. Por otro lado, la síntesis del glucógeno se regula mediante la activación de la glucógeno sintasa e inactivación de la glucógeno fosforilasa, permitiendo que los miocitos almacenen glucosa como reserva energética para las condiciones de ayuno (6).

3.1.6 Efectos de la insulina sobre el cerebro.

Además de sus efectos en el músculo esquelético y el hígado, la insulina también ejerce influencia en el cerebro. Aunque se produce principalmente en el páncreas, se ha demostrado que también se produce en ciertas neuronas y astrocitos en modelos de ratas. La insulina afecta a las neuronas, la microglía y los astrocitos a través de la señalización de

las vías PI3K/AKT y la vía de MAPK. La vía PI3K/AKT está involucrada en el metabolismo de lípidos y glucosa, y puede tener efectos sobre el desarrollo neurológico y la plasticidad neuronal a través de la participación de FoxO. Por otro lado, la vía de MAPK, que señala a través de las kinasas de serina/treonina (RAF) y las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), está asociada con la neurogénesis, la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal. Además, se ha informado que la insulina puede modular la respuesta conductual al medio, la memoria y la toma de decisiones (7).

Interesantemente, la producción y liberación de insulina están parcialmente reguladas por proteínas CLOCK, que tienen una influencia en el reloj circadiano. Las proteínas CLOCK y BMAL1 regulan la expresión de genes implicados en señales insulínótropas y la exocitosis de insulina. Tanto la insulina como la leptina, que es producida por el tejido adiposo, muestran variación circadiana y ultradiana en su liberación (8).

3.1.7. Regulación fisiológica de la glucosa en condiciones de ayuno.

Durante el ayuno, el hígado produce aproximadamente entre el 80- 85 % de la producción endógena de glucosa. La mitad es derivada de glucogenólisis y la otra mitad de gluconeogénesis, las cuales mantienen las concentraciones de glucosa plasmática en un rango de 80 a 100 mg/dL (3). El resto de la glucosa plasmática proviene de la gluconeogénesis renal (9), asegurando así un suministro constante de glucosa para el cerebro, que consume el 50% de la glucosa plasmática, seguido del músculo esquelético (20 %), el riñón (10 %), el tejido adiposo (5 %) y otros tejidos (15 %) (10).

A diferencia de la regulación de la secreción de insulina en bolo, descrita anteriormente, la regulación de la insulina en fase basal es más compleja. La insulina basal se secreta de

forma pulsátil, aproximadamente cada 4 minutos, y está influenciada por ritmos circadianos y ultradianos, así como por el sistema simpátovagal, y los sistemas neuroendocrino y cardiovascular. Este patrón de secreción es compartido con la secreción de osteocalcina, una hormona derivada del hueso. Se ha propuesto que la osteocalcina podría ser un regulador central de la insulina basal, influenciada a su vez por la producción de cuerpos cetónicos.

En condiciones de ayuno, la lipólisis del tejido adiposo proporciona sustratos para la producción de cuerpos cetónicos (3), que pueden promover la secreción de osteocalcina. Esta hormona puede regular la secreción de insulina de manera directa o mediada por la serotonina y el GLP-1. A su vez, el incremento de serotonina y GLP.-1 inhibe la secreción del glucagón e incrementa la liberación de insulina. Cuando los niveles de insulina aumentan, ejercen retroalimentación negativa en el hígado, disminuyendo la liberación de cuerpos cetónicos. Esta disminución en los niveles de cetonas regula negativamente la osteocalcina, lo que conduce a una disminución en los niveles de insulina, serotonina y GLP-1, y finalmente a un aumento en la liberación de glucagón y cuerpos cetónicos. Este ciclo de retroalimentación regula la homeostasis de la glucosa durante el ayuno (1).

En condiciones de ayuno prolongado, que puede iniciar desde los 5 días, el músculo esquelético puede experimentar proteólisis para utilizar los aminoácidos en piruvato en el hígado y generar más glucosa. La oxidación de proteínas aumenta significativamente cuando las reservas de lípidos alcanzan el 10% del peso corporal (11).

3.2. Metabolismo de las HDLs.

Las lipoproteínas están constituidas por una capa externa de fosfolípidos y colesterol libre, estabilizado por apolipoproteínas, y un núcleo lipídico que contiene colesterol esterificado y triglicéridos. Su función fisiológica principal es transporte de lípidos, el cual se realiza mediante tres vías interconectadas: 1) la vía exógena: implica el transporte de lípidos provenientes de la dieta mediante los quilomicrones, que proporcionan ácidos grasos libres a los tejidos. Los remanentes de quilomicrones son dirigidos al hígado para su metabolismo. 2) El transporte endógeno: las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se sintetizan en el hígado y son transportadas hacia células y tejidos para distribuir el colesterol. Y 3) el transporte reverso del colesterol que es realizado por las HDLs (12).

Las HDLs se sintetizan en el hígado, donde la apolipoproteína A1 (ApoA1) nascente adquiere lípidos y su forma discoidal inicial, conforme las HDLs adquieren lípidos, fosfolípidos y colesterol crecen en tamaño hasta adoptar forma esférica (13). Estas lipoproteínas tienen la capacidad de intercambiar colesterol esterificado por triglicéridos con otras lipoproteínas ricas en triglicéridos mediante la acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), lo que les permite aumentar de tamaño. Como resultado, las HDL pueden variar en forma, tamaño y composición macromolecular, clasificándose como HDL2 (HDL2a y HDL2b), de mayor tamaño, y HDL3 (HDL3a, HDL3b y HDL3c), de menor tamaño (14,15).

Se han identificado más de 300 lipoproteínas asociadas a las HDLs. Las principales apolipoproteínas que integran las HDL son: ApoA1, apolipoproteína AII, apolipoproteína CI, y apolipoproteína CIII. También se asocian otras proteínas como la paraoxonasa 1, que proporciona actividad antioxidante y la lecitina-colesterol-acil-transferasa, responsable de la esterificación de colesterol, y por lo tanto, del crecimiento de las partículas de HDLs (16).

Además, Las HDL pueden colectar una serie de proteínas y moléculas que no participan en el metabolismo de las lipoproteínas, pero que tienen funciones homeostáticas relevantes como proteínas de fase aguda, inhibidores de proteasas, microRNAs, anticuerpos y componentes del complemento (17).

La función ateroprotectora más relevante de las HDL es el eflujo de colesterol, que es el primer paso del transporte reverso de colesterol. Este proceso es considerado la vía más importante para el catabolismo del colesterol, ya que transporta el exceso de colesterol de los tejidos periféricos de regreso al hígado, donde se metaboliza y se excreta en forma de sales biliares, contribuyendo así a reducir la carga aterogénica (18). Además, las HDLs tienen otras funciones ateroprotectoras, como su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiapoptótica, antitrombótica, anti-diabética, y vasodilatadora (Figura 3) (14).

Funcionalidad

Glicemia

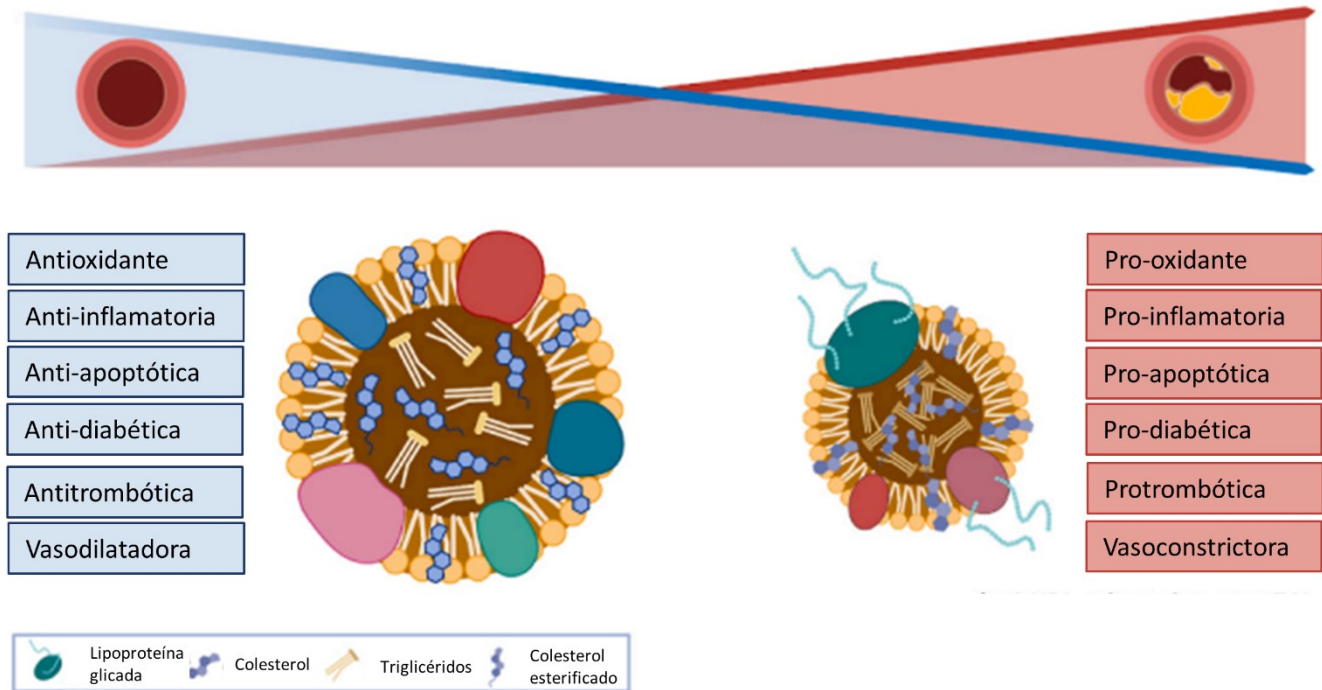


Figura 3. Heterogeneidad de las partículas de HDLs. La composición de lípidos, proteínas y colesterol influye en sus funciones ateroprotectoras, las cuales están afectadas en condiciones de hiperglucemia como la diabetes tipo 2. (15).

3.3. Tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo es un órgano que regula múltiples funciones metabólicas, equilibrio energético y homeostasis endocrina. Este tejido se compone de depósitos de grasa específicos y discretos, cada uno con características distintivas en origen de desarrollo, morfología, metabolismo, actividad endocrina respuesta inmune y capacidad de remodelación. Se clasifica en varios tipos principales: el tejido adiposo blanco, encargado

principalmente del almacenamiento de energía y con la capacidad de expandirse para almacenar lípidos; el tejido adiposo café o marrón, especializado en la termogénesis al generar calor mediante el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa; el tejido adiposo beige, que puede desempeñar ambas funciones; y el tejido adiposo rosa, que desempeña un papel fundamental durante el periodo de lactancia. (19)

El tejido adiposo blanco desempeña un papel crucial en la regulación del equilibrio energético mediante el almacenamiento y liberación de ácidos grasos, un proceso regido por el equilibrio dinámico entre la lipogénesis y la lipólisis. Este equilibrio es esencial para mantener la homeostasis energética, especialmente durante el ayuno o el ejercicio ((20).

La expansión fisiológica saludable del tejido adiposo se caracteriza por un aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) en lugar del incremento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia). Este proceso está estrechamente relacionado con las capacidades angiogénicas del tejido adiposo y la presencia de células progenitoras del tejido adiposo. La angiogénesis, un proceso altamente coordinado, implica la proliferación, migración, invasión y formación de nuevos vasos sanguíneos. La expansión del tejido adiposo se ve influenciada por varios factores, como la hipoxia, la inflamación y la remodelación estructural de los vasos sanguíneos. (21) La señalización paracrina juega un papel crucial en el vínculo funcional entre las células endoteliales, adipocitos y células progenitoras del tejido adiposo. Los adipocitos pueden secretar tanto moléculas proangiogénicas, que promueven el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, como factores antiangiogénicos, como las serpinas, que inhiben este proceso. Este equilibrio entre señales pro y antiangiogénicas regula la expansión del tejido adiposo y su capacidad para adaptarse a las demandas metabólicas del organismo (19). Además, las células progenitoras tienen múltiples funciones como la

renovación celular, la capacidad adipogénica y las propiedades angiogénicas, y secretan una variedad de moléculas bioactivas implicadas en la remodelación de la matriz vascular, lo que permite una expansión saludable del tejido adiposo (20,22)

3.4. Diabetes Mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica de etiología múltiple caracterizada por hiperglicemia crónica y alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Según su origen, las alteraciones metabólicas de la diabetes mellitus son causadas por una deficiencia en la síntesis o secreción de insulina, reducción en el número de células beta pancreáticas, alteraciones en la señalización de la insulina en diferentes órganos o una alteración en la función de otras hormonas que participan en la regulación de la homeostasis energética (23).

3.4.1 Clasificación de la diabetes de acuerdo a la asociación americana de la diabetes (ADA)

La Asociación Americana de Diabetes clasifica los diferentes tipos de la enfermedad en las siguientes categorías:

1. Diabetes tipo 1: Originada por la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, lo que generalmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo 1 suele manifestarse en individuos jóvenes y delgados, presentando síntomas como poliuria, sed y pérdida de peso, con propensión a la cetosis. Sin embargo, la diabetes tipo 1 puede desarrollarse a cualquier edad, a veces con progresión lenta. En casos de progresión lenta, se denomina diabetes autoinmune latente en adultos, y la dependencia de insulina se desarrolla en unos pocos años.

2. Diabetes tipo 2: Es causada por una pérdida progresiva de la secreción de insulina por parte de las células beta, frecuentemente asociada a resistencia a la insulina, la obesidad (especialmente de tipo central) y un estilo de vida sedentario. En las etapas iniciales, se observa resistencia a la insulina y una respuesta alterada de la insulina de primera fase, lo que provoca hiperglicemia postprandial. Esto es seguido por alteraciones de la repuesta de segunda fase de la insulina, lo que con el tiempo puede contribuir a la hiperglicemia persistente en ayunas.
3. Diabetes Mellitus gestacional: La diabetes gestacional se debe a los cambios hormonales que se producen en el embarazo. Se define como cualquier caso de intolerancia a la glucosa diagnosticado por primera vez en el embarazo. Esta clasificación se aplica tanto a los casos en que la condición se revierte después del parto, que son la mayoría, como a aquellos en los que la anomalía persiste después del embarazo (22).
4. Tipos específicos de diabetes por otras causas; como síndromes de diabetes monogénica (por ejemplo, diabetes neonatal y la diabetes de inicio en la madurez de jóvenes, conocida como MODY), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y la pancreatitis) y diabetes inducida por químicos o fármacos (por ejemplo, uso de glucocorticoides, en el tratamiento de VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos).
5. Trastornos del metabolismo de la glucosa. Aunque estas no son un tipo de diabetes, la glucosa de ayuno alterada y la intolerancia a la glucosa son etapas de prediabetes que refleja la historia natural de la progresión de normoglicemia hacia la diabetes tipo 2 (23,24).

3.4.2. Criterios para el diagnóstico de prediabetes y diabetes tipo 2:

Criterios para diagnosticar la prediabetes:

1. Glucosa de ayuno entre 100 mg/dL y 125mg/dL.
2. Glucosa a las 2 horas después de una carga oral de glucosa (75g), con valores entre 140 mg/dLy 199 mg/dL.
3. Hemoglobina glicada (HbA1C) con valores entre 5.7% y 6.49%.

Criterios para diagnosticar la diabetes tipo 2:

1. Glucosa de ayuno mayor a 125mg/dL.
2. Glucosa a las 2 horas después de una carga oral de glucosa (75g), con valores mayores a 200 mg/dL.
3. HbA1C mayor a 6.5 %.

3.4.3 Historia natural de la diabetes tipo 2.

La diabetes tipo 2 se desarrolla a través de múltiples vías, impulsada por factores genéticos y ambientales que resultan en la pérdida progresiva de masa y/o función de las células beta, manifestándose finalmente como hiperglucemia (Figura 4) (24). El aumento de la hiperglicemia en la diabetes tipo 2 puede deberse a diferentes patologías interrelacionadas, como la disminución de la función de la célula beta, la resistencia a la insulina central (hepática) y/o periférica (muscular), el aumento de la producción hepática de glucosa asociada, y la disfunción del tejido adiposo (25).

Existe un debate sobre si la hiperinsulinemia es el resultado de la resistencia a la insulina o si precede a esta condición (26). Aunque estudios previos han demostrado que estas condiciones se pueden desarrollar simultáneamente (27), otros investigadores apoyan la idea de que los fenotipos de resistencia a la insulina pueden iniciar y progresar por separado, coincidiendo ambas condiciones justo antes de que se establezca la diabetes tipo 2 (28). Diferentes reportes apoyan la hipótesis de que la hiperinsulinemia podría ser la causa de la resistencia a la insulina (29,30).

La figura 4 muestra las alteraciones metabólicas propuestas, las cuales pueden iniciar desde la infancia. Además del papel de la herencia genética, el aumento de la adiposidad y su estado funcional puede determinar el inicio de hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina (Figura 4, etapa 1). En la etapa 2, se conserva una “salud metabólica” relativa, pero hay presencia de la resistencia a la insulina y la acumulación de lípidos ectópicos que contribuye a una discreta elevación de la glucosa en ayuno. Estos factores tienen efectos en la disfunción temprana de la célula beta (etapa 3) y en la pérdida de la primera fase de secreción de insulina (etapa 4). Como consecuencia, la regulación de la glucosa se altera en el páncreas, lo que da lugar a la intolerancia a la glucosa, seguida de una incapacidad para regular las concentraciones de glucosa en ayuno (etapa 5). La intolerancia a la glucosa y la glucosa de ayuno alterada son condiciones conocidas como prediabetes. Cuando las células beta pierden la capacidad de secretar insulina se manifiesta la diabetes tipo 2 (etapa 6) (31). En la etapa final se desarrollan las complicaciones vasculares como retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedad cerebrovascular, enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica (32).

3.4.4 Prediabetes.

La prediabetes es una etapa intermedia, previa a la diabetes, en la que existen alteraciones en el metabolismo de la glucosa, originadas por defectos en la secreción de la insulina y defectos en la sensibilidad en diferentes órganos y tejidos. Como consecuencia, se puede presentar la hiperinsulinemia e hiperglucemia. Esta etapa es heterogénea y se ha propuesto que existen diferentes fenotipos metabólicos. Por un lado, se reconocen dos fenotipos principales: La glucosa de ayuno alterada, la cual se caracteriza por resistencia a la insulina hepática y sensibilidad a la insulina muscular normal, con defectos en la respuesta secretora de insulina a la glucosa en la fase temprana. El segundo fenotipo es la intolerancia a la glucosa, la cual se asocia principalmente con la resistencia a la insulina muscular, y una respuesta secretora de insulina disminuida tanto en fase temprana como en fase tardía.(33). Otros autores proponen una secuencia de cuatro etapas progresivas en el desarrollo de la enfermedad: etapa 1, de larga duración y caracterizada por normoglucemia e hiperinsulinemia; etapa 2, con hiperinsulinemia una elevación moderada de la glucosa; etapa 3, con hiperglucemia e hiperinsulinemia; y finalmente, la etapa 4, que constituye la diabetes tipo 2 franca (1). Hay un debate en torno al uso del término prediabetes, ya que, se ha observado que entre el 30-60% de los individuos con prediabetes no progresan a diabetes tipo 2 en periodo de 9 años (34,35). Por otro lado, el uso de este término podría sugerir que no se necesita una intervención, dado que no existe una enfermedad establecida. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud utiliza el término “hiperglucemia intermedia” como una categoría de alto riesgo para diabetes tipo 2 (36).

La prediabetes es una condición heterogénea y se ha observado que la glucosa de ayuno alterada se caracteriza por una reducción de la sensibilidad hepática, disfunción de células beta estacionaria y/o disminución crónica de la masa de células beta, secreción alterada del GLP-1 y secreción inapropiada de glucagón. Por otro lado, la intolerancia a la glucosa presenta una afectación de la sensibilidad a la insulina en órganos periféricos y una sensibilidad casi conservada en el hígado, junto con la pérdida progresiva de la función de las células beta (37). Además, el riesgo asociado para desarrollar diabetes tipo 2 también es diferente entre los fenotipos de prediabetes. Por ejemplo, se ha observado que la tasa de progresión a diabetes tipo 2 es exponencial entre los individuos con valores más altos de glucosa en ayuno, mientras que el riesgo basado en los valores de glucosa a las 2 horas es lineal (38).

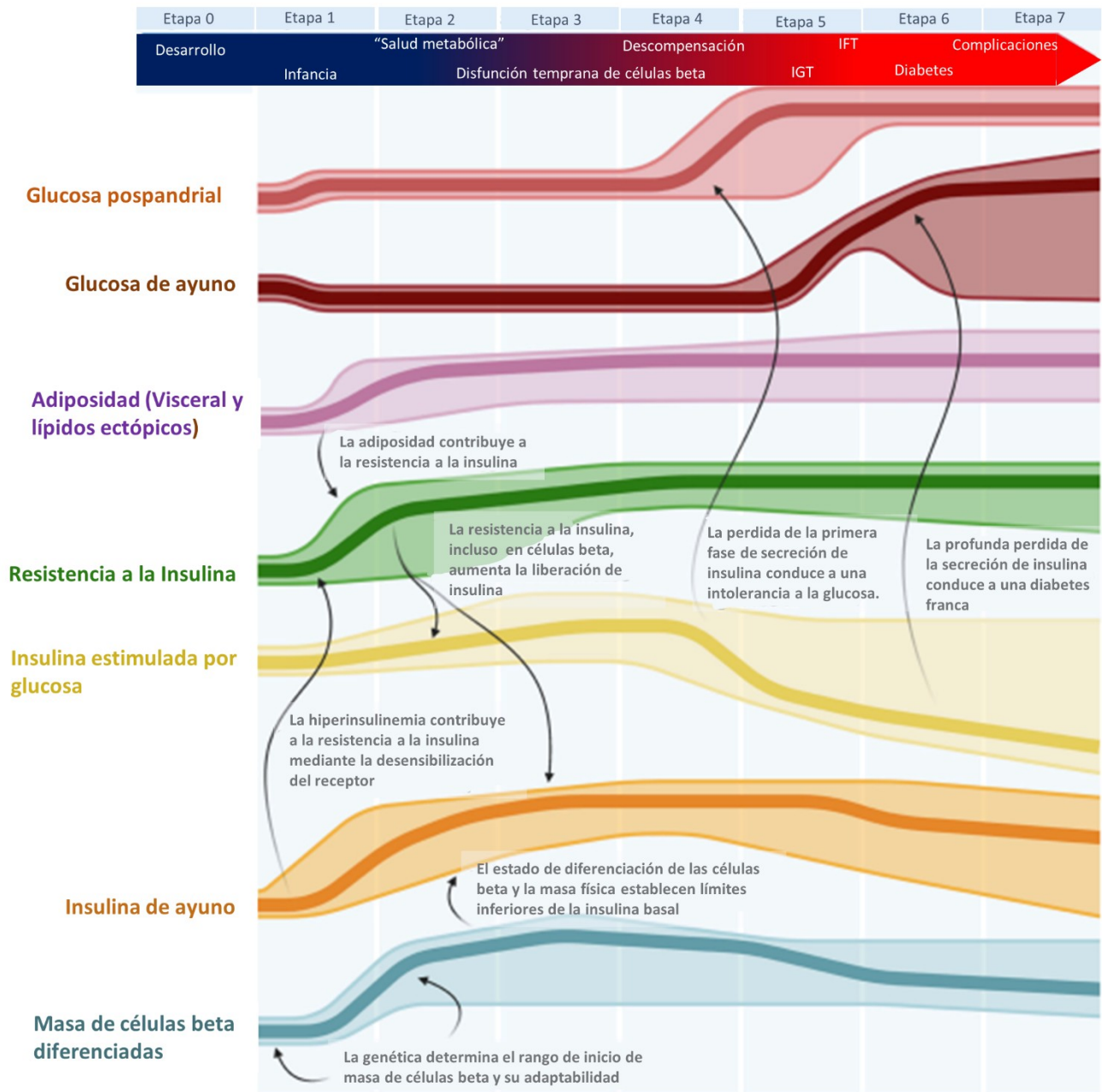


Figura 4a. Historia natural de la diabetes tipo 2 en multietapas. Las líneas gruesas representan un promedio aproximado de la latencia de una variable fisiopatológica clave asociada con la progresión a diabetes tipo 2. Las líneas delgadas representan una gama de estas variables fenotípicas reflejadas en varios subtipos de la enfermedad. Tomado de Johnson et al. (31).

3.4.5 Patogénesis de la diabetes tipo 2.

La presencia de la resistencia a la insulina en diferentes tejidos puede ocasionar una disminución en la absorción de glucosa periférica en músculo y tejido adiposo, entre otros, con un aumento de la producción de glucosa endógena, es decir producción hepática (39). El tejido adiposo incrementa la lipólisis de los triglicéridos, liberando ácidos grasos libres, lo cual contribuye para una mayor producción de glucosa hepática y acumulación de triglicéridos intrahepáticos (Figura 5). Además, se produce una disminución en la producción de adipocitocinas, las cuales regulan indirectamente la glucosa. En el páncreas, se produce una alteración en el equilibrio entre las células beta y las células alfa. La masa de células beta experimenta apoptosis y puede ser hasta un 30-40% menor en comparación con individuos no diabéticos (40). Este desequilibrio puede deberse a un efecto directo de la hiperglicemia, los ácidos grasos libres o la inflamación inducida por estrés oxidativo en el páncreas (41). La disminución en la secreción de insulina resulta en niveles más elevados del glucagón, lo cual eleva la glucosa debido a un incremento de la gluconeogénesis (42).

En el hígado, la resistencia a la insulina, junto con la deficiencia de insulina y el aumento del glucagón, incrementan la sensibilidad al glucagón, lo que resulta en un mayor uso de sustratos como ácidos grasos libres, lactato, glicerol y aminoácidos que contribuyen a la hiperglucemia (43). En el riñón se produce un aumento de la gluconeogénesis renal y la reabsorción de glucosa a través del cotransportador 2 de sodio/glucosa (SGLT-2) (44). En el tracto gastrointestinal, se reduce la secreción de incretinas, y se atenúan los efectos supresores del apetito por parte de la insulina, la leptina, el GLP-1, la amilina y el péptido YY (45).

La inflamación puede tener diferentes orígenes. En el tejido adiposo, se pueden incrementar las concentraciones de interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y el contenido de macrófagos, los cuales inducen resistencia a la insulina a través de las vías de señalización como la kinasa- β de I κ B, las cinasas MAPK8 y MAPK p38, las cuales pueden fosforilar residuos de serina del IRS-1 y 2. Los ácidos grasos libres activan receptor tipo toll-4 (TLR4), el cual señala a través de las cinasas IKK, y JNK para la fosforilación de serinas en los IRS y bloqueando su fosforilación (4).

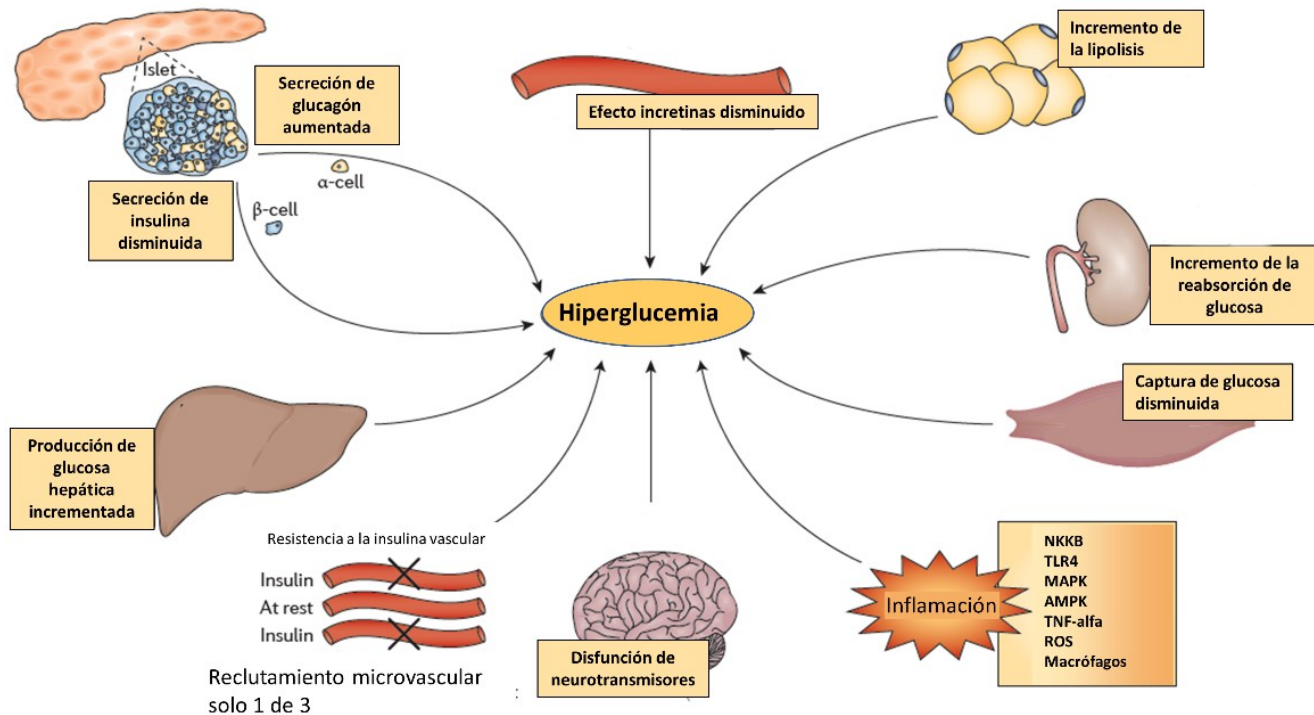


Figura 5. Patogénesis de la diabetes tipo 2. La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina en el músculo y el hígado, así como la alteración en la secreción de las células beta. En el páncreas, la disminución en la sensibilidad a la insulina provoca una resistencia a la acción del péptido 1. El aumento en los niveles del glucagón contribuye a elevar la producción hepática de

glucosa. La resistencia a la insulina en los adipocitos induce una mayor lipólisis, lo que resulta en la liberación de ácidos grasos libres en la circulación. Estos ácidos grasos libres agravan la resistencia a la insulina en el músculo y el hígado, y contribuyen al deterioro de las células beta (β -cell). Además, se produce un aumento en la reabsorción renal de glucosa a través del cotransportador 2 de sodio/glucosa y un incremento en el umbral para la excreción de glucosa en la orina, lo cual contribuye a mantener la hiperglucemia. A estos mecanismos se suma la resistencia a los supresores del apetito, los niveles bajos de dopamina, la resistencia vascular y la inflamación mediada la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), el factor nuclear- κ B (NF- κ B), el receptor tipo Toll 4 (TLR4) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Tomado de DeFronzo et al. (46).

3.4.6. Factores de riesgo de la diabetes tipo 2:

Obesidad.

Entre los diversos factores que contribuyen a la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta (Cuadro1), la obesidad ha sido fuertemente asociada con la diabetes tipo 2. Hasta un 50 % de los individuos con diabetes tipo 2 presentan obesidad y aproximadamente un 90% de ellos tienen sobrepeso (47). Se reconoce que la obesidad es una condición heterogénea, y los depósitos de grasa están asociados de manera diferencial con la diabetes tipo 2. La obesidad central, y especialmente la acumulación de grasa visceral, se relaciona más estrechamente con el desarrollo de diabetes tipo 2 en comparación con la grasa subcutánea (48).

Disfunción del tejido adiposo.

En la última década, ha surgido un interés considerable en el papel del tejido adiposo blanco, ya que su aumento de volumen correlaciona con la inflamación crónica de bajo grado. Durante el aumento de peso, los adipocitos pueden experimentar un aumento en número (hiperplasia) o en tamaño (hipertrofia). La hiperplasia, un mecanismo de adaptación benigno, permite manejar el acúmulo de lípidos sin muchas afectaciones metabólicas. Sin embargo, cuando predomina la hipertrofia con insuficiente adipogénesis, los adipocitos incrementan su tamaño debido a la acumulación de lípidos (49). Esta expansión puede provocar una disminución en la difusión de oxígeno, lo que a su vez puede inducir la transcripción del factor inducible por hipoxia 1-alfa. Como consecuencia, la hipoxia resultante puede producir estrés oxidativo y simultáneamente, disminuir la captación de glucosa en los adipocitos (50). La presencia de hipoxia y estrés oxidativo, tanto a nivel local como sistémico, generan señales de daño o “alarminas” que promueven la activación de los macrófagos residentes. Estos macrófagos son los principales productores de interleucinas 6, 8 (IL-6, IL-8), y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (51), lo cual estimula la llegada de más macrófagos, manteniendo así la inflamación crónica de bajo grado, característica de la obesidad (52). Si persisten las condiciones de hipoxia, estrés oxidativo y resistencia a la insulina, los adipocitos pueden sufrir apoptosis o incluso necrosis (53), y pueden acumularse macrófagos alrededor del adipocito, conocidos como macrófagos en corona (22). Durante la obesidad, el número de macrófagos incrementa significativamente, representando alrededor del 30-40% de las células presentes en tejido adiposo (54).

Cuadro 1. Factores de riesgo para Diabetes tipo 2.

Edad
Ascendencia no blanca
Historia familiar de diabetes tipo 2
Componentes del síndrome metabólico: Circunferencia de cintura mayor a 80 en mujeres y 90 en hombres; presión arterial elevada (sistólica ≥ 130 mmHg y/o diastólica ≥ 85 mmHg); Triglicéridos ≥ 150 mg/dl; Colesterol de HDL < 40 mg/dl en hombres y < 50 en mujeres; Partículas de LDL pequeñas y densas. *
Sobrepeso u obesidad / Obesidad abdominal
Síndrome de ovario policístico
Historia de enfermedad coronaria
Dieta no saludable consumo regular de bebidas azucaradas y carnes rojas, bajo consumo de granos y productos ricos en fibra.
Tabaquismo.
Estilo de vida sedentario.
Historia de diabetes gestacional
Presencia de acantosis nigricans
Factores sicosociales y económicos.

Definición de síndrome metabólico del Grupo de Trabajo sobre Epidemiología y Prevención de la Federación Internacional de Diabetes (55). HDLs: lipoproteínas de alta densidad. LDL: lipoproteínas de baja densidad.

Dislipidemia en la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2.

La resistencia a la insulina tiene efectos metabólicos que aumentan la producción de VLDL en hígado o disminuyen su depuración, lo que resulta en un incremento de los remanentes de VLDL. Estos remanentes pueden convertirse en lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas debido a la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos (Figura 6), y como tienen baja afinidad por el receptor de LDL, permanecen más tiempo circulación (56,57).

En cuanto al colesterol de alta densidad (C-HDL), su reducción en la diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina se debe en parte al intercambio de triglicéridos por colesterol esterificado en las HDL. Cuando las lipoproteínas de alta densidad (HDLs) se enriquecen con triglicéridos, son más susceptibles a la hidrólisis por la lipasa hepática. Después, los remanentes de HDLs son rápidamente catabolizados, disminuyendo los niveles de C-HDL (56,58). La presencia de esta dislipidemia, conocida como dislipidemia aterogénica, aumenta el riesgo cardiovascular (59).

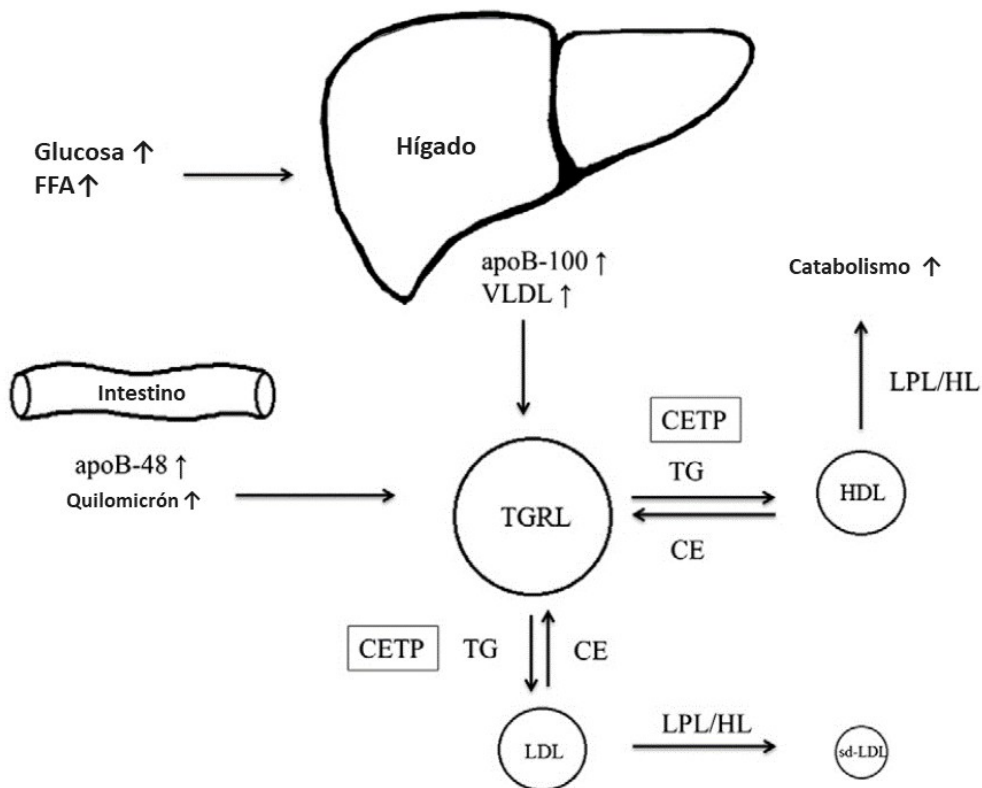


Figura 6. Metabolismo de lipoproteínas en condiciones de resistencia a la insulina. El incremento de glucosa y los ácidos grasos libres (FFA) inducen una mayor secreción de VLDL. Además, se observa un aumento en la producción de ApoB-48 y quilomicrones, lo que resulta en un enriquecimiento de triglicéridos de las TGRL. La CETP facilita el intercambio de TG por CE en HDLs y LDL. Debido a la acción de las lipasas LPL/HL, se generan remanentes de HDLs que son fácilmente depurados, así como sd-LDL que son más aterogénicos. VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. FFA: ácidos grasos libres. TG: triglicéridos. TGRL: lipoproteínas ricas en triglicéridos. HDL: lipoproteína de alta densidad. LDL: lipoproteínas de baja densidad. CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol. LPL: lipasa lipoproteica. HL: lipasa hepática. sd-LDL: LDL pequeñas y densas. Tomado de Wu y Parhofer (58).

Las alteraciones en el metabolismo lipídico también afectan la composición y estructura de las HDLs. El enriquecimiento de triglicéridos y la depleción de colesterol esterificado provocan cambios en las proteínas de superficie de las HDLs, afectando su orientación y su capacidad de interacción con los receptores (60). Además, la sustitución de proteínas en las HDLs puede alterar sus actividades biológicas (Figura 3). Por ejemplo, la pérdida de enzimas como la paraoxonasa 1, la acetil hidrolasa del factor activador plaquetario, la aciltransferasa lecitín-colesterol, así como la disminución de la ApoA1, reducen la capacidad antioxidante de las HDLs (61). Así mismo, cuando la ApoA1 es reemplazada por el amiloide A sérico, se ha observado un aumento de la actividad proinflamatoria. Por último, el enriquecimiento del lisofosfatidilcolina, isoprostanos y esfingomielina también pueden influir en las propiedades de las HDLs (62).

Además, el enriquecimiento de triglicéridos y la depleción de colesterol esterificado, resulta en HDLs de tamaño más pequeños. Este menor tamaño se ha asociado con defectos en el metabolismo observados en la diabetes tipo 2 (19), el síndrome metabólico (20), el hígado graso (21) y la acumulación de grasa visceral (22). En la diabetes tipo 2, la alteración en la relación triglicéridos-colesterol y la depleción de Apo A1 podrían explicar la disminución en el

eflujo de colesterol mediado por los receptores scavenger clase B tipo 1 y el transportador del cassette de unión a ATP 1 (63). Incluso, la disminución del tamaño de las HDLs se ha identificado como un factor de riesgo cardiovascular (23).

Disfunción endotelial.

El término “disfunción endotelial” se refiere a la pérdida de la capacidad del endotelio para mantener la homeostasis adecuada. Generalmente, se utiliza para indicar pérdida o disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico. Sin embargo, esta condición también puede indicar un incremento en la producción de vasoconstrictores y una regulación alterada de la inflamación, la trombosis y el crecimiento celular en la pared vascular (64). Los factores relajantes del endotelio como el óxido nítrico, la prostaciclina, y los factores hiperpolarizantes derivados del endotelio contribuyen a la no adhesividad y permeabilidad selectiva de esta barrera (65).

Se considera que la disfunción endotelial es el evento inicial en el desarrollo de la aterosclerosis (66). La exposición crónica a factores de riesgo y al estrés oxidativo causan la pérdida de la integridad vascular, induce la proliferación de células del músculo liso y aumenta la adhesividad endotelial a las células del sistema inmune (Figura 7) (67). La inflamación juega un papel relevante, ya que, en presencia de factores de riesgo, el endotelio activado expresa moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1), que facilitan la adherencia de los leucocitos al endotelio. La expresión de otras moléculas, como la proteína

quimioatrayente de monocitos 1, el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) y el factor de necrosis tumoral beta (TNF-beta), contribuyen a exacerbar la inflamación del endotelio y promueven la aterosclerosis (64). La disfunción endotelial asociada con la diabetes tipo 2 puede iniciarse en la etapa de la prediabetes y se asocia inversamente con las concentraciones de glucosa plasmática en ayuno y glucosa plasmática a las 2 horas después de una carga oral de glucosa (68). La disfunción micro y macro-vascular en pacientes con diabetes tipo 2 aumenta significativamente el riesgo de nefropatía, retinopatía y enfermedad cardiovascular (69).

Células progenitoras endoteliales.

La restauración del daño vascular depende, en parte, de la capacidad de varias subpoblaciones de células progenitoras endoteliales (70). Estas células tienen un origen hematopoyético y se caracterizan por los marcadores CD133⁻/CD34⁺/KDR⁺/VE-cadherina. Sin embargo, su abundancia relativa en circulación sanguínea es muy baja, entre 0.01% y 0.0001 % del total de células mononucleares periféricas (PBMC) (71), lo que limita su estudio y aplicaciones. Otro grupo de progenitores endoteliales relevantes son las células multipotenciales derivadas de monocitos que presentan un fenotipo CD14⁺/ CD45⁺/ CD34⁺/ Colágena I⁺, las cuales tienen capacidad de diferenciarse a células endoteliales (72). En comparación con las células progenitoras endoteliales, las células multipotenciales derivadas de monocitos tienen una abundancia mayor (5%-10%), por lo que podrían tener un papel más relevante en la restauración vascular (73).

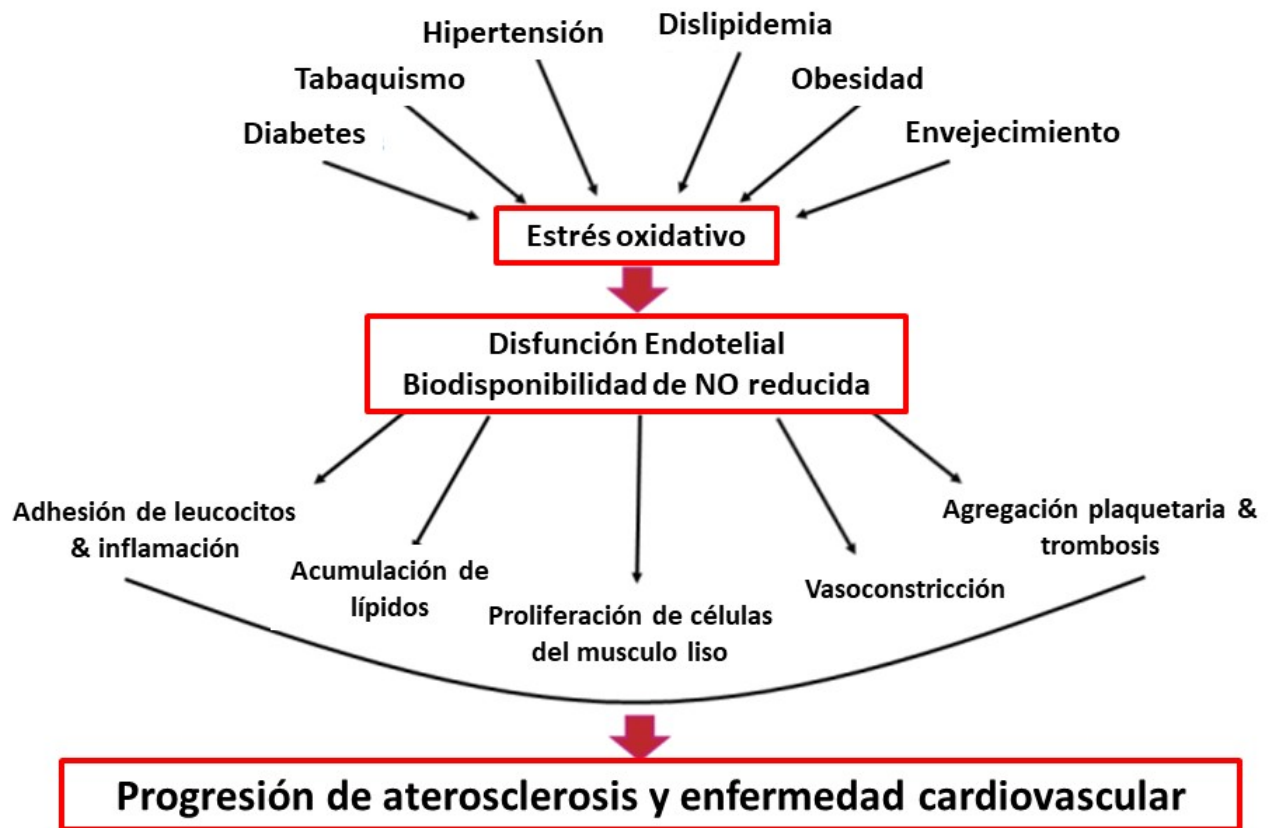


Figura 7. Progresión de factores de riesgo cardiovascular a la aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, mediada por el estrés oxidativo y disfunción endotelial. Se considera que la pérdida de la función endotelial es el evento inicial de la aterosclerosis, aunque también es un proceso reversible. Tomado de Park et al. (67).

4. Planteamiento del problema

La diabetes tipo 2 es un trastorno metabólico caracterizado por niveles elevados de glucosa en ayuno, triglicéridos y LDL pequeñas, así como niveles bajos de C-HDL, lo que aumenta el riesgo cardiovascular (46). Las anomalías descritas en la diabetes tipo 2 comienzan durante la etapa de prediabetes, en la cual, la glucosa en ayunas está elevada, pero por debajo del valor para el diagnóstico de diabetes tipo 2.

Las HDLs son complejos heterogéneos que varían en forma, tamaño y contenido de lípidos y proteínas. Estas lipoproteínas tienen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-apoptóticas, antitrombóticas y vasodilatadoras (74), además de promover la eliminación del colesterol de los macrófagos en la región subendotelial, lo que previene el desarrollo de la aterosclerosis (14). Se ha descrito que durante la diabetes tipo 2, la estructura de las HDLs se caracteriza por una distribución de subpoblaciones predominantemente de menor tamaño (75), con enriquecimiento en el contenido de triglicéridos y menor contenido de colesterol esterificado (62). Estas modificaciones estructurales junto con la hiperglucemia crónica, reducen la actividad antioxidante y afectan al eflujo de colesterol promovido por las lipoproteínas (76–78).

El tejido adiposo blanco es un órgano metabólicamente activo que regula procesos fisiológicos como los niveles de lípidos, la presión arterial y la angiogénesis (79). La disfunción del tejido adiposo que acompaña a la diabetes tipo 2, se caracteriza por alteraciones en la secreción de adipocitocinas (reducción de adiponectina y aumento de leptina y resistina) (80). El índice adiponectina/leptina se ha propuesto como un marcador clínico útil para evaluar el funcionamiento del tejido adiposo (81,82), incluso mejor que otros

índices de resistencia a la insulina (83). Este índice se ha asociado con concentraciones anormales de C-HDL y triglicéridos, independiente del índice de masa corporal (84). Por otro lado, el índice de resistencia a la insulina del tejido adiposo (ATIR), que refleja la desregulación metabólica de la lipólisis, puede estimarse fácilmente multiplicando los valores séricos de insulina por el valor de ácidos grasos libres (85–87), se ha asociado a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (86), la resistencia a la insulina, la alteración de la glucosa de ayuno y la diabetes tipo 2 temprana (88,89). Existe evidencia de que en individuos con disfunción del tejido adiposo, evaluado por el índice ATIR, tienen HDLs de menor tamaño comparados con sujetos sin disfunción del tejido adiposo (90).

La disfunción endotelial en pacientes con diabetes tipo 2 conduce a complicaciones vasculares como nefropatía o cardiopatía diabética (46,68). Aunque los mecanismos de reparación endotelial no se comprenden completamente, diferentes poblaciones de células progenitoras participan en este proceso (91). Una de estas poblaciones, son las células multipotenciales derivadas de monocitos que expresan CD14 (92,93), y que contribuyen a la restauración del endotelio vascular (94). Resultados previos han descrito que las HDLs de sujetos sanos promueven la angiogénesis (95,96) y rescatan la angiogénesis alterada en la diabetes tipo 2 (97). Sin embargo, se ha observado que las HDLs de pacientes con diabetes tipo 2 alteran el desarrollo de las células progenitoras (98,99), impidiendo su participación en la reparación de la carótida lesionada en ratones desnudos (100).

La disfunción del tejido adiposo y la disfunción vascular son procesos determinantes en la diabetes temprana. Es necesario investigar cómo las características estructurales de las HDLs, como la glicación, el tamaño y la composición macromolecular, se relacionan con estos procesos. El tejido adiposo podría influir sobre las propiedades de las HDLs, y estas a

su vez, tener efectos sobre la diferenciación de células progenitoras hacia el fenotipo endotelial. Comprender estas interacciones podría proporcionar información relevante sobre el impacto de las HDLs en la diabetes temprana y las complicaciones asociadas.

5. Justificación.

La diabetes tipo 2 es un problema de salud pública que tiene un impacto significativo en la calidad de la vida humana y en los gastos en salud. Las complicaciones asociadas con la diabetes aumentan la mortalidad por causas cardiovasculares. A nivel global se estima que la mortalidad ha aumentado de 151 millones a 463 millones de casos entre 2000 y 2019 (101). La incidencia de diabetes tipo 2 alcanza su valor máximo a los 55 años y no muestra diferencia por sexo (102) Se prevé que la prevalencia mundial se incremente del 6.28 % al 7.1 % para el año 2030, lo que representa aproximadamente 7,079 casos por cada 100,000 individuos. (102)

En México, la prevalencia de diabetes tipo 2 ha incrementado de manera sostenida de 14.4 a 18.3 % para el año 2022, mientras que la prediabetes se estima alrededor del 22.1 % (103). Esta es una condición de alto riesgo para desarrollar diabetes tipo 2 y se estima que hasta el 70% de las personas con prediabetes podrían desarrollar diabetes tipo 2 (35).

El aumento en la enfermedad está relacionado con la alta prevalencia de obesidad en el país, causada por los hábitos alimenticios y la baja actividad física. La obesidad afecta al 75.2 % de la población adulta mayor de 20 años, con un 39.1 % en sobrepeso y un 36.1% en

obesidad (104). Además, la diabetes tipo 2 está estrechamente asociada con el síndrome metabólico, el cual tiene una prevalencia del 56.3 % según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de 2018, lo que representa aproximadamente 36.5 millones de mexicanos en riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (105).

6. Preguntas de investigación

1. ¿En pacientes con diabetes tipo 2 recién diagnosticada, cómo afectan la glicación, el tamaño y la composición macromolecular de las HDLs al proceso de diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos hacia el fenotipo endotelial?
2. ¿Existe una relación entre la glicación, el tamaño y la composición macromolecular de las HDLs y el estado funcional del tejido adiposo en la diabetes temprana?

7. Hipótesis

La glicación, la composición lipídica y proteínica el tamaño pequeño de las HDLs inhiben la capacidad de diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos hacia el fenotipo endotelial y está relacionada a la disfunción del tejido adiposo.

8. Objetivos

Objetivos Primario:

Investigar el impacto de la glicación, el tamaño y la composición macromolecular de las HDLs sobre el proceso de diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos hacia el fenotipo endotelial, así como la disfunción del tejido adiposo a lo largo del espectro de la diabetes tipo 2.

Objetivos secundarios:

- I) En sujetos con normoglucemia, prediabetes y diabetes tipo 2 de recién diagnóstico, comparar las concentraciones de los productos de glicación tempranos, intermedios y avanzados en las HDLs.
- II) Evaluar los marcadores séricos de inflamación y funcionalidad del tejido adiposo en los tres grupos de estudio
- III) Evaluar la asociación de la inflamación y los marcadores séricos de disfunción de tejido adiposo con el tamaño y la glicación de las HDLs.

9. Metodología

Participantes del estudio.

La población de estudio incluyó una muestra a conveniencia del brazo control del estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (88), así como de trabajadores del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez en la Ciudad de México, México. Los criterios de inclusión fueron: hombres y mujeres de entre 40 y 60 años de edad, con índice de masa corporal $\leq 33 \text{ Kg/m}^2$, que previamente hubieran tenido una medición de glucosa plasmática en ayuno y no presentar antecedentes personales de enfermedad cardiovascular, renal o tiroidea. Aquellos individuos bajo tratamiento antihipertensivo o hipolipemiente fueron excluidos del estudio. Los criterios de eliminación incluyeron niveles de enzimas hepáticas superiores a tres veces los valores de referencia para nuestra población (aspartato amino-transferasa $> 126 \text{ UI/L}$, niveles de alanina amino-transferasa $> 123 \text{ UI/L}$), triglicéridos superiores a 600 mg/dL (lo cual podría interferir con el cálculo del colesterol de LDL [C-LDL]), y valores de proteína C-reactiva de alta sensibilidad $> 10 \text{ mg/L}$ para descartar la presencia de un proceso inflamatorio agudo. Para dividir a los participantes en grupos, se utilizaron los siguientes parámetros de la Asociación Americana para la Diabetes (35): el grupo normoglucémico, compuesto por 20 individuos con glucosa en ayuno $< 100 \text{ mg/dL}$ y glucosa a las 2 horas $< 140 \text{ mg/dL}$; el grupo de prediabetes, conformado por 20 individuos con glucosa en ayuno de $100\text{-}125 \text{ mg/dL}$, y el grupo de pacientes con diabetes tipo 2 recién diagnosticada, que presentaba menos de 4 años de evolución y glucosa en ayuno $> 125 \text{ mg/dL}$ o glucosa a las 2 horas $> 199 \text{ mg/dL}$. Siete sujetos con diabetes tipo 2 estaban recibiendo tratamiento con metformina y dos de ellos también recibían inhibidores de DPP4. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes, y el proyecto

fue aprobado por la comisión de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Determinaciones de bioquímica clínica.

Se recolectaron 20 mL de sangre para obtener plasma y suero después de un ayuno de 12 horas. Las muestras de sangre se separaron y se congelaron inmediatamente a -70°C hasta su análisis. Las siguientes determinaciones se realizaron utilizando procedimientos estándar con un analizador automatizado (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania): colesterol total, C-HDL, glucosa en ayunas, triglicéridos, ApoA1, apolipoproteína B-100 (ApoB-100), hemoglobina A1C (HbA1C), aspartato amino-transferasa, alanina amino-transferasa, creatinina y proteína C-reactiva. El coeficiente de variación entre los ensayos fue inferior al 6% en todas las determinaciones. El C-LDL se calculó con el uso de la fórmula de DeLong et al. (106). La tasa de filtración glomerular se calculó mediante la fórmula de la Colaboración En Epidemiología de la Enfermedad Renal Crónica [29]. La insulina, adiponectina total, leptina, resistina, péptido C y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) se determinaron mediante el sistema de inmunoensayo Bio-Plex Multiplex (Bio-rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.). Los ácidos grasos libres se determinaron mediante un ensayo de colorimetría enzimática (Wako Diagnostics, Osaka, Japón) con un coeficiente interensayo $<3\%$. Los siguientes marcadores séricos se consideraron indicadores de la funcionalidad del tejido adiposo: El índice ATIR, el cual se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\text{ATIR} = \text{ácidos grasos libres (mmol/L)} \times \text{concentración de insulina } (\mu\text{UI/L})$ (86,88). También se evaluó el índice ATIR/adiponectina y la relación adiponectina/leptina.

Caracterización de HDLs.

Las HDLs se aislaron del plasma de los individuos utilizando ultracentrifugación secuencial en función de su densidad, entre 1.063 y 1.21 g/mL. Se utilizó una solución de bromuro de potasio con EDTA al 0.5 g/L, seguida de diálisis exhaustiva con buffer salino de fosfatos a 10 mM y pH 7.4 (107). Para determinar la composición macromolecular de HDLs, se midió la concentración de proteína utilizando el método de Lowry, y se determinó el contenido de lípidos (triglicéridos, colesterol total, colesterol esterificado y fosfolípidos) utilizando reactivos colorimétricos de Wako Diagnostics (FujiFilm Wako Diagnostics, California, EE. UU.). La proporción de cada componente se estimó como un porcentaje de la masa total de HDLs. El tamaño y las subpoblaciones de las HDLs se determinaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gradiente del 4 % al 30 % en condiciones no desnaturizantes. Luego se realizó un análisis densitométrico del gel para estimar el tamaño de partícula promedio de las HDLs y las subclases HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, y HDL3c (108). Las subclases se expresaron como una proporción relativa del 100%.

El contenido de fructosamina en las HDLs se determinó utilizando un reactivo colorimétrico en un analizador automático (Cobas Integra Fructosamine, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los productos intermedios, grupos dicarbonilo, se determinaron como se informó previamente (109). Se utilizaron HDLs aisladas e incubadas con 2,4-dinitro-fenilhidracina en HCl 2,5 N durante 15–60 min a 25 °C. Luego se precipitaron con ácido tricloroacético al 20 % (peso/volumen), se centrifugaron y lavaron con ácido tricloroacético al 10% (peso/volumen). El precipitado se disolvió con guanidina HCl 6 M añadida a la placa, y se incubó durante 10 minutos a 37 °C antes de medir la absorbancia a 370 nm con un espectrofotómetro de

microplacas Biotek Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, Vermont, EE. UU.). Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) se cuantificaron utilizando el kit comercial de ELISA competitivo OxiSelect (STA-817, Cell Biolabs, California, EE. UU.), que identifica las especies de carboximetil lisina y pentosidina.

Aislamiento de las células multipotenciales derivadas de monocitos.

Se obtuvieron 50 mL de sangre periférica de donadores voluntarios del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Los donadores tuvieron una edad entre 18-65 años, con peso corporal mayor a 50 KG, sin enfermedades crónicas y sin tratamiento farmacológico. La muestra sanguínea se utilizó después de descartar la presencia de infecciones como gripe, hepatitis C, hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana, sífilis y enfermedad de Chagas. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) Las PBMC se sembraron en una placa recubierta de fibronectina con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB, Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.), L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/mL y estreptomina 50 µg/mL, a una densidad de 20×10^6 células y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h. Se descartaron las células no adherentes y se utilizaron las células adherentes (monocitos frescos) como células control o para inducir las células multipotenciales derivadas de monocitos como se describió anteriormente (73). Brevemente, los monocitos frescos adherentes se cultivaron con medio basal de crecimiento endotelial-2 suplementado con suero bovino fetal al 5%, VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina-1, y ácido ascórbico (Lonza Pharma, Basilea, Suiza) a 37°C en una atmósfera de

CO₂ al 5% hasta que alcanzaron la confluencia. Se agregó medio de cultivo fresco cada tres días hasta que las células se cosecharon para los análisis de citometría de flujo.

Expresión marcadores endotelial en las células multipotenciales derivadas de monocitos.

Las células multipotenciales derivadas de monocitos se cultivaron siguiendo el método descrito previamente (73). Después de 24 h se retiró el medio y se lavaron con RPMI-1640 sin suplementar. A continuación, se incubaron con 50 µg/mL de HDLs aisladas de los individuos de los tres grupos durante 45 min, en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS 10 mM y se cambió el medio a medio basal de crecimiento endotelial-2. Después de 4 días, las células se separaron con 1 mL de tripsina EDTA (0,25 %), se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. en la oscuridad, con la dilución óptima previamente determinada de los siguientes anticuerpos primarios diluidos en buffer salino-Tris: anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14-Peridinin-Chlorophyll-protein (PerCP) (cat. 301848, 1:20), anti-CD34-aloficocianina (APC) (cat. 343608, 1:40), y anti-VEGFR2/KDR-PE (cat. 359904, 1:60) de la marca BioLegend (San Diego, California, EE. UU.). Al final del período de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 20 min, se lavaron con PBS/albúmina al 3 % y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences, California, EE. UU.). Se capturaron 5,000 eventos por experimento para su análisis mediante el software FlowJo (Becton Dickinson, Oregón, EE. UU.).

Análisis estadístico.

En el presente estudio, se llevó a cabo un análisis de estimación del tamaño de muestra utilizando el tamaño de HDLs como variable principal (110), con una potencia del 80% y un intervalo de confianza del 95%. Según este análisis, se determinó que se requerían 16 sujetos para detectar diferencias significativas en tamaño de las HDLs entre los grupos de estudio. Se evaluó la normalidad de las variables continuas y se expresaron como media \pm desviación estándar o mediana (rango Intercuartil), según correspondiera. Las variables categóricas se reportaron como el número de sujetos y su prevalencia.

Las diferencias en las medias se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Para comparar las medianas, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que la prueba de chi-cuadrado para analizar los valores de prevalencia. Se utilizó la correlación de Pearson para evaluar la relación entre los productos de glicación de las HDLs y la expresión de KDR en las células multipotenciales derivadas de monocitos.

Para calcular el coeficiente beta estandarizado, se empleó la regresión lineal univariada. Finalmente, se utilizó la regresión lineal múltiple para construir modelos de asociación entre los marcadores del tejido adiposo, el tamaño y la glicación de las HDLs. En el modelo 1 se ajustaron los resultados por edad y sexo, mientras que el modelo 2 incluyó al modelo 1 y el índice de masa corporal, el C-HDL y los triglicéridos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software Stata 12 IC (StataCorp LLC, College Station, Texas, EE. UU.).

10. Resultados

10.1 Características clínicas de la población estudiada.

En la Tabla 1 se presentan las características de los individuos incluidos en el estudio. No se observaron diferencias significativas en cuanto a edad, proporción de sexo, tasa de filtrado glomerular, prevalencia de tabaquismo y concentración plasmática de colesterol total, C-LDL, triglicéridos, ApoA1, apolipoproteína B-100, aspartato amino-transferasa, alanina amino-transferasa, y proteína C reactiva de alta sensibilidad. El índice de masa corporal fue ligeramente mayor en el grupo de prediabetes en comparación con el grupo de normoglucémicos ($28.1 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$ vs. $25.3 \pm 3.3 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.039$), pero similar al grupo de diabetes tipo 2 ($27.9 \pm 3.9 \text{ kg/m}^2$). Como se esperaba, los valores de hemoglobina A1C fueron significativamente más altos en los grupos de prediabetes (5.85 %) y diabetes tipo 2 (6.58 %) en comparación con el grupo normoglucémico (5.51%) ($p < 0.001$). La concentración de C-HDLs fue significativamente menor en el grupo de diabetes tipo 2 (38.2 mg/dL) en comparación con los grupos de prediabetes (44.4 mg/dL) y normoglucemia (51.5 mg/dL) ($p < 0.05$).

10.2. Caracterización de las HDLs de los grupos de estudio.

Se encontró una concentración significativamente mayor de fructosamina en las HDLs de las personas con diabetes tipo 2 ($5.2 \text{ } \mu\text{mol/mg}$ de proteína) en comparación con las personas normoglucémicas ($4.6 \text{ } \mu\text{mol/mg}$, $p < 0.04$). Esta diferencia también se observó en los AGEs en las HDLs, con una mayor concentración en individuos con DM ($14.3 \text{ } \mu\text{g-BSA-AGE/mg}$ de proteína) en comparación con los sujetos normoglucémicos ($7.7 \text{ } \mu\text{g-BSA-AGE/mg}$ de proteína, $p < 0.01$). En el grupo de prediabetes, la concentración de los tres productos de

glicación de las HDLs no fue significativamente diferente comparada con el grupo normoglucémico (Figura 8).

Tabla 1. Características clínicas y metabólicas de los grupos de estudio.

	Normo glucémico n=20	Prediabetes n=20	Diabetes tipo 2 n=20	Valor-p
Edad (años)	49 ± 6.5	52 ± 5.9	51 ± 5.3	0.187
Sexo (masculino/femenino)	7/13	7/13	10/10	0.535
Índice de masa corporal (kg/m ²)	25.3 ± 3.3	28.1 ± 4.1 *	27.9 ± 3.9	0.039
Tabaquismo (%)	3 (15)	6 (30)	2 (10)	0.320
Hemoglobina A1C (%)	5.51 (5.3-5.6)	5.85 (5.8-6.1) *	6.58 (6.5-7.4) *†	<0.001
Glucosa de ayuno (mg/dL)	89.1 (83-95)	100 (96-105) *	126 (112-148) *†	<0.001
Colesterol total (mg/dL)	194 (167-220)	203 (178-217)	171 (157-208)	0.260
C-LDL (mg/dL)	122 (95-142)	127 (115-149)	108 (91-137)	0.250
C-HDL (mg/mL)	51.5 (39-60)	44.4 (41-59)	38.2 (31-48) *†	0.019
Triglicéridos (mg/mL)	108 (82-150)	115 (102-171)	148 (123-181)	0.158
ApoA1 (mg/dL)	151 ± 29	141 ± 19	139 ± 27	0.376
ApoB-100 (mg/dL)	109 ± 27	115 ± 29	115 ± 26	0.608
AST (UI/L)	20 (18-24)	18.4 (16-23)	22 (17-25)	0.457
ALT (UI/L)	22 (14-37)	19 (14-29)	25 (19-36)	0.235
Tasa de filtrado glomerular (mL*min/1.73m ²)	93.6 (85-104)	97 (87-103)	103 (84-109)	0.614
Proteína C- Reactiva (mg/L)	1.42 (0.8-2.2)	1.08 (0.61-2.8)	1.9 (0.9-5.1)	0.320

Los valores se expresan como media ± desviación estándar, median (rango intercuartil) o número de sujetos (%).

HDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; C-LDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad;

AST: aspartato amino-transferasa; ALT: Alanina amino-transferasa. * $P < 0.05$ vs normoglucémicos, † $p < 0.05$ vs Prediabetes.

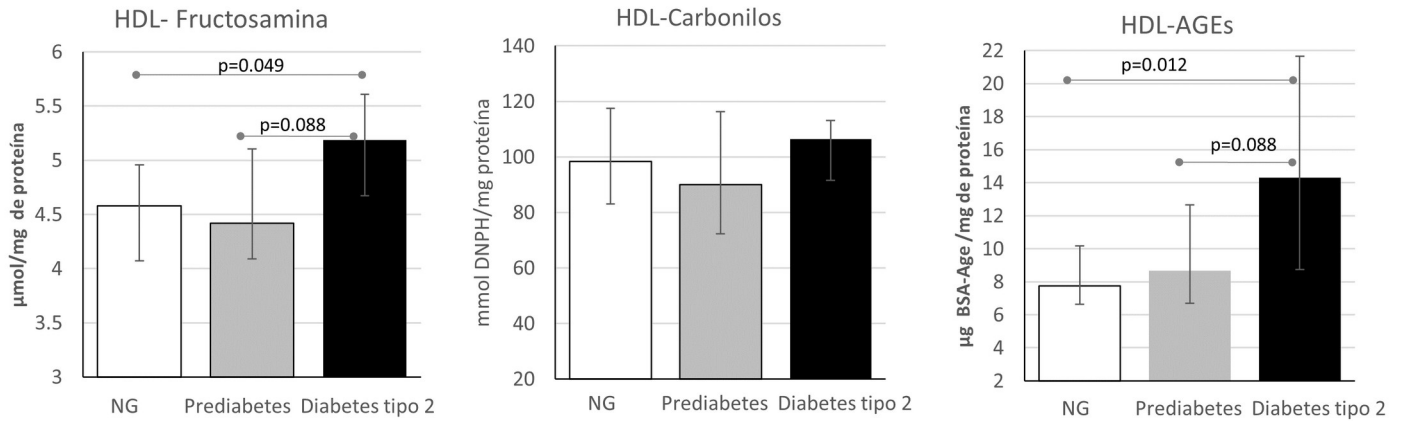


Figura 8. Productos de glicación en las HDLs. Los productos de glucosilación tempranos (fructosamina), intermedios (carbonilos) y avanzados (AGEs) en HDLs aisladas de sujetos normoglucémicos (NG), prediabetes y diabetes tipo 2. $N=20$, los valores de p se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

El tamaño de las HDLs fue significativamente menor en los sujetos con diabetes tipo 2 en comparación con los individuos con prediabetes o normoglucemia (8.32 nm frente a 8.44 nm y 8.51 nm, respectivamente, $p < 0.039$). Además, se observó una disminución significativa en la proporción de HDL2b y HDL2a, y un aumento en HLA3c en las HDLs de los individuos con diabetes tipo 2 ($p < 0.01$) en comparación con los individuos con prediabetes o normoglucemia (Tabla 2). Es interesante destacar que la composición macromolecular de las

HDLs, en términos del porcentaje de contenido de colesterol libre y esterificado, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas fue muy similar entre los tres grupos (Tabla 2).

Table 2. Subpoblaciones y composición de las partículas de las HDLs.

	Normoglucémicos n=20	Prediabetes n=20	Diabetes tipo 2 n=20	Valor-p
HDL2b (%)	8.8 ± 3.9	7.83 ± 2.2	6.28 ± 2.6 *†	0.018
HDL2a (%)	17.5 ± 3.7	15.4 ± 3.8	13.4 ± 4.9 *†	0.001
HDL3a (%)	23.2 ± 2.7	23.4 ± 2.6	21.5 ± 4.2	0.105
HDL3b (%)	25.4 ± 2.7	26.4 ± 2.6	25.9 ± 2.6	0.430
HDL3c (%)	24 ± 6.6	27.0 ± 5.7	32.6 ± 10 *†	0.010
Diámetro promedio- HDLs (nm)	8.51 ± 0.2	8.44 ± 0.2	8.32 ± 0.22 *†	0.002
Colesterol libre-HDLs (%)	1.96 (1.72-2.22)	1.74 (1.22-2.32)	1.79 (1.23-2.21)	0.598
Colesterol esterificado-HDLs (%)	20.1 (18-22)	20.7 (19-21)	20.6 (19-21)	0.964
Fosfolípidos-HDLs (%)	3.8 (3.1-4.4)	3.4 (2.9-4.5)	4.1 (2.9-5.9)	0.502
Triglicéridos-HDLs (%)	21.7 (20-22)	21.6 (20-22)	21.5 (20-22)	0.866
Proteína-HDLs (%)	51.8 (50-53)	52.7 (50-54)	51.3 (48-55)	0.778

Los valores son expresados como promedio ± desviación estándar, mediana (rango intercuartil).

** P<0.05 vs normoglucémico, † p<0.05 vs Prediabetes.*

10.3. Marcadores séricos de disfunción del tejido adiposo.

Entre los marcadores séricos de disfunción de tejido adiposo, tanto el índice ATIR como el índice ATIR/adiponectina estuvieron más elevados en los grupos con glucosa anormal en comparación con el grupo normoglucémico, siendo la diferencia significativa en el grupo de diabetes tipo 2 (Tabla 3). La adiponectina y la relación adiponectina/leptina mostraron tendencia a tener valores más bajos en los

grupos de glucosa anormal. Por otro lado, la insulina, el HOMA-IR y la relación HOMA-IR/adiponectina estaban significativamente elevados en el grupo de diabetes tipo 2. No se observaron diferencias significativas en otros marcadores del metabolismo de la glucosa y moléculas inflamatorias entre los grupos.

Tabla 3. Marcadores de disfunción del tejido adiposo, glucosa e inflamación por categoría de diabetes.

	Normoglucémico n=17	Prediabetes n=17	Diabetes tipo 2 n=18	Valor-p
<i>Marcadores de disfunción del tejido adiposo</i>				
ATIR	4.12 ± 2.5	5.96 ± 2.8	7.85 ± 4.6 *	0.009
ATIR/adiponectina	0.52 (0.12-0.7)	0.74 (0.3-1.22)	1.1 (0.55-1.9) *	0.047
Adiponectina/leptina	4.22 (1.4-13.3)	2.8 (1.4-6.1)	2.4 (1.31-5)	0.564
Adiponectina (µg/mL)	8.48 (5.8-26)	8.99 (4.3-18)	7.0 (4.5-17)	0.808
<i>Marcadores de metabolismo de glucosa y lípidos</i>				
Insulina (µUI/L)	5.97 (5.3-10.8)	9.97 (6.7-13) *	12 (8.1-18) *	0.027
HOMA-IR	1.28 (1.1-2.2)	2.5 (1.6-3.4) *	3.8 (2.8-6.2) *†	<0.001
HOMA-IR/Adiponectina	0.15 (0.04-0.40)	0.32 (0.1-0.43)	0.70 (0.20-1.4) *	0.029
Péptido C (pg/mL)	607 ± 259	663 ± 241	790 ± 415	0.391
Leptina (ng/mL)	2.58 (0.8-6.1)	4.6 (3.0-6.1)	3.1 (0.92-4.3)	0.265
Ácidos grasos libres (mmol/L)	0.56 ± 0.18	0.59 ± 0.14	0.61 ± 0.2	0.544
<i>Marcadores inflamatorios</i>				
Resistina (ng/mL)	3.8 ± 1.4	3.5 ± 0.7	3.6 ± 1.3	0.822
PAI-1 (ng/mL)	7.4 ± 2.6	7.1 ± 2.3	7.6 ± 2.1	0.809
Proteína C-Reactiva (mmol/L)	1.41 (0.8-2.2)	1.02 (0.7-1.6)	1.6 (0.92-5.0)	0.504

*Los valores son expresados como media \pm desviación estándar, mediana (rango inter-cuartil). * $P < 0.05$ vs normoglucémicos, † $p < 0.05$ vs prediabetes. ATIR: Resistencia a la insulina del tejido adiposo. HOMA-IR; Modelo homeostático de resistencia a la insulina; PAI-1; Inhibidor del activador del plasminógeno-1.*

10.4. Asociación de las características de HDLs con marcadores de disfunción del tejido adiposo.

Las correlaciones simples con tamaño o la glicación de las HDLs se muestran en la Figura 9 y la Figura 10, respectivamente. Después de ajustar por edad, sexo e índice de masa corporal, se encontró una asociación inversa entre el tamaño de HDLs y la relación ATIR/adiponectina, HOMA/adiponectina, resistina, PAI-1 y una asociación directa con los niveles de C-HDL (tabla 4, modelo 1). Estas asociaciones se mantuvieron significativas después de ajustar adicionalmente por C-HDL y triglicéridos (Tabla 4, modelo 2). Por otro lado, los AGEs en HDLs se correlacionaron directamente con ATIR, la relación ATIR/adiponectina, insulina y HOMA-IR (tabla 4, modelo 1). Después del ajuste adicional por C-HDL y triglicéridos, la asociación se mantuvo para el índice ATIR, insulina y HOMA-IR (tabla 4, modelo 2). En el modelo final, solo ATIR y la insulina se asociaron significativamente con los AGEs en HDLs (Tabla 4, modelo 3).

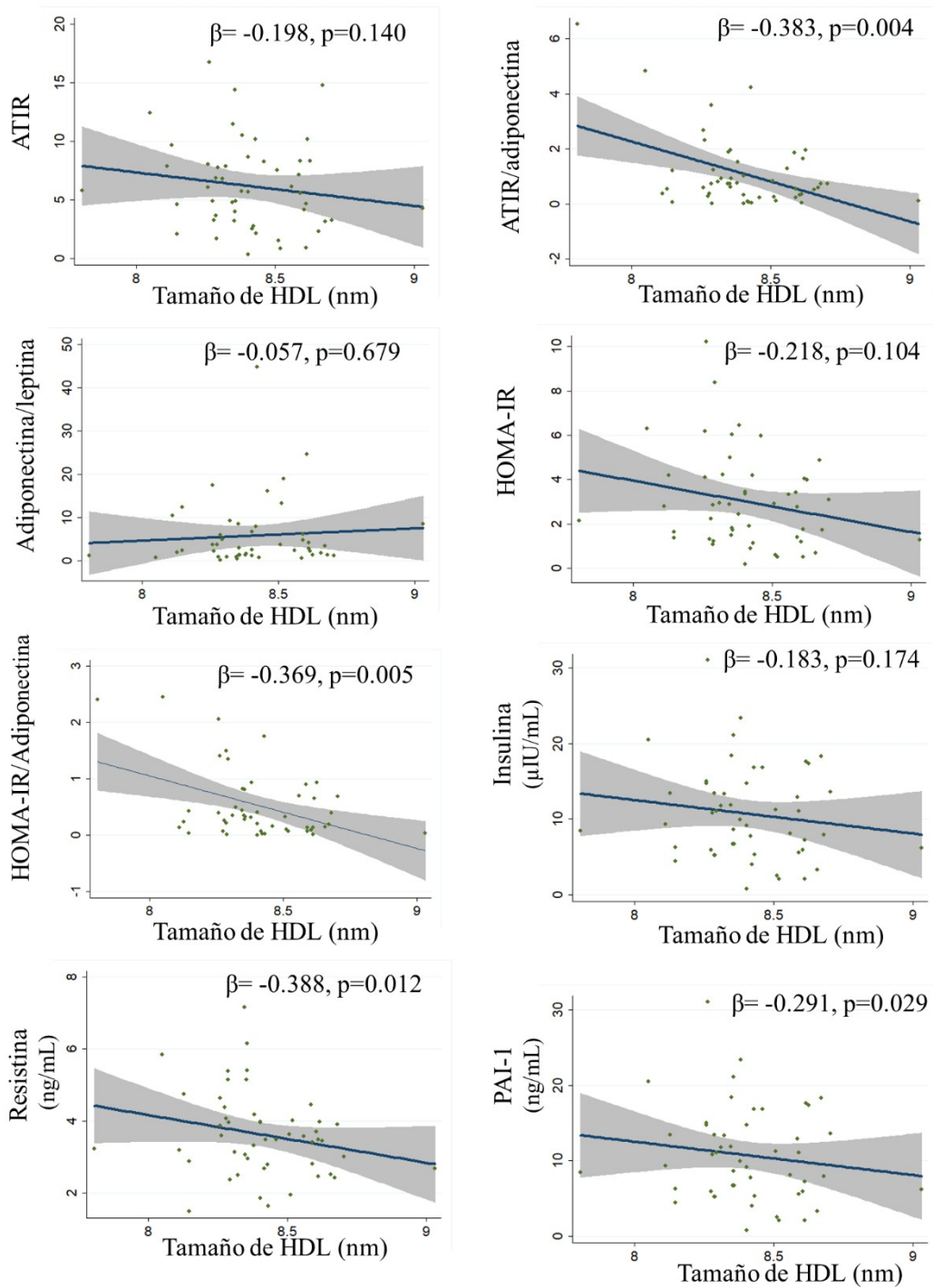
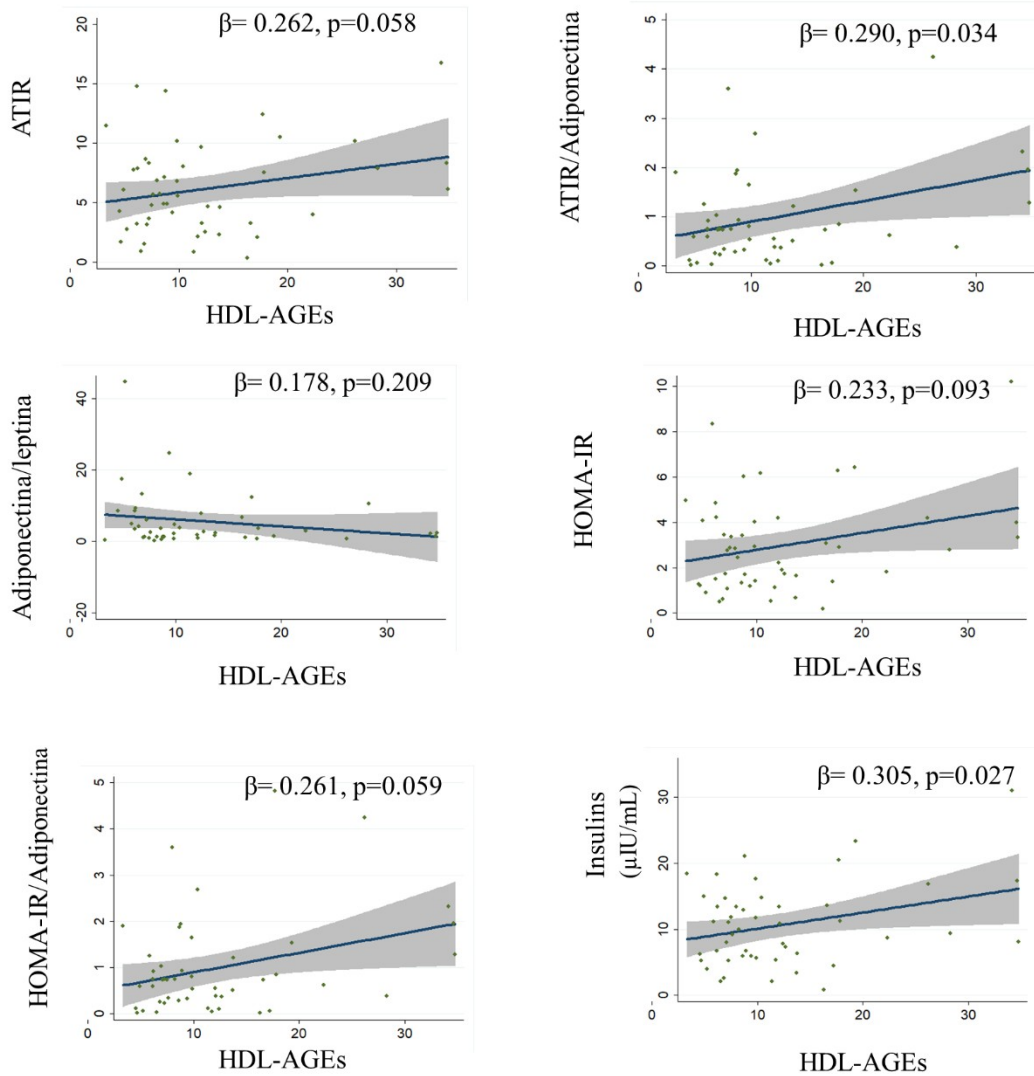


Figura 9. Correlaciones entre el tamaño de las HDLs y marcadores séricos de disfunción del tejido adiposo, metabolismo de la glucosa e inflamación en todos los individuos estudiados. Los valores se expresan como coeficientes beta estandarizados en análisis de regresión univariante. ATIR: resistencia

a la insulina del tejido adiposo. HOMA-IR; modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; PAI-1; inhibidor del activador del plasminógeno 1.



Figura

10. Correlaciones entre los AGEs en HDLs y marcadores séricos de disfunción del tejido adiposo, marcadores, metabolismo de la glucosa e inflamación en todos los sujetos estudiados. Los valores se expresan como coeficiente beta estandarizado en análisis de regresión univariable. ATIR: resistencia a la insulina del tejido adiposo. HOMA-IR; modelo homeostático para evaluar la resistencia a la

Tabla 4. Asociación de marcadores séricos de disfunción del tejido adiposo, marcadores del metabolismo de la glucosa e inflamación con el tamaño y la glicación de HDLs en toda la población

	Tamaño de HDLs (nm)		^a HDL-AGEs ($\mu\text{g-BSA-AGE}/\text{mg}$ proteína)	
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 1	Modelo 2
<i>Marcadores de disfunción del tejido adiposo.</i>				
ATIR	-0.137		0.339*	0.380*
ATIR/adiponectina	-0.387*	-0.281*	0.286*	
Adiponectina/leptina	0.044		-0.212	
Adiponectina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.097		-0.238	
<i>Metabolismo de lípidos y glucosa</i>				
Insulina ($\mu\text{IU}/\text{mL}$)	-0.137		0.448*	0.463*
HOMA-IR	-0.236		0.309*	0.315*
HOMA-IR/Adiponectina	-0.382*	-0.261*	0.294*	
Colesterol HDL (mmol/L)	0.466*	0.544*	-0.137	
Triglicéridos (mmol/L)	-0.025		0.025	
Ácidos grasos libres (mmol/L)	-0.027		0.061	
<i>Marcadores de inflamación</i>				
Resistina (ng/mL)	-0.329*	-0.304*	0.096	
PAI-1 (ng/mL)	-0.331*	-0.370*	-0.006	
Proteína C-Reactiva (mg/L)	-0.077		0.212	

Los valores se expresan como coeficientes beta estandarizados. * $p < 0,005$. a) $n = 48$ para el análisis con HDL-AGEs. ATIR: resistencia a la insulina del tejido adiposo. HOMA-IR modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; PAI-1; inhibidor del activador del plasminógeno 1.

Modelo 1: ajustado por edad, y sexo.

Modelo 2: ajustado por edad, y sexo, índice de masa corporal, C-HDL y triglicéridos.

10.5. Aislamiento y caracterización de las células multipotenciales derivadas de monocitos.

Para evaluar la diferenciación de monocitos frescos al fenotipo endotelial (expresión de KDR-APC), se incubaron monocitos frescos utilizando el medio RPMI o el medio basal endotelial 2 durante 14 días. Después de eso, se observó un aumento transitorio de la expresión de KDR con un pico importante en el día 4 (Figura 11A). En comparación con los monocitos frescos mantenidos con medio RPMI (Figura 11B), los monocitos frescos incubados con EBM2 (Figura 11C) aumentaron su tamaño (FSC) y granularidad (SCC) después de 4 días, tiempo al que se consideraron como células multipotenciales derivadas de monocitos. En las células multipotenciales derivadas de monocitos determinamos una mayor proporción de células que expresan CD14/KDR (Q1: 22,0 % vs 17,1 %), CD14/CD34 (Q3: 13,0 % vs 6,7%) y CD14/CD34/KDR (36,1 % vs 3,1 %) (Figura 11B y 11C). El análisis comparativo indicó un aumento significativo de CD14+/KDR+ (24,3 % vs 50,2 %) y CD14+CD34+KDR+ (3,6 % vs 8,1 %), pero no en CD14+/CD34+ (7,0 % vs 9,3 %) entre las células multipotenciales derivadas de monocitos (Figura 11D). La viabilidad celular fue similar después de 4 días entre las condiciones del medio RPMI y EBM2.

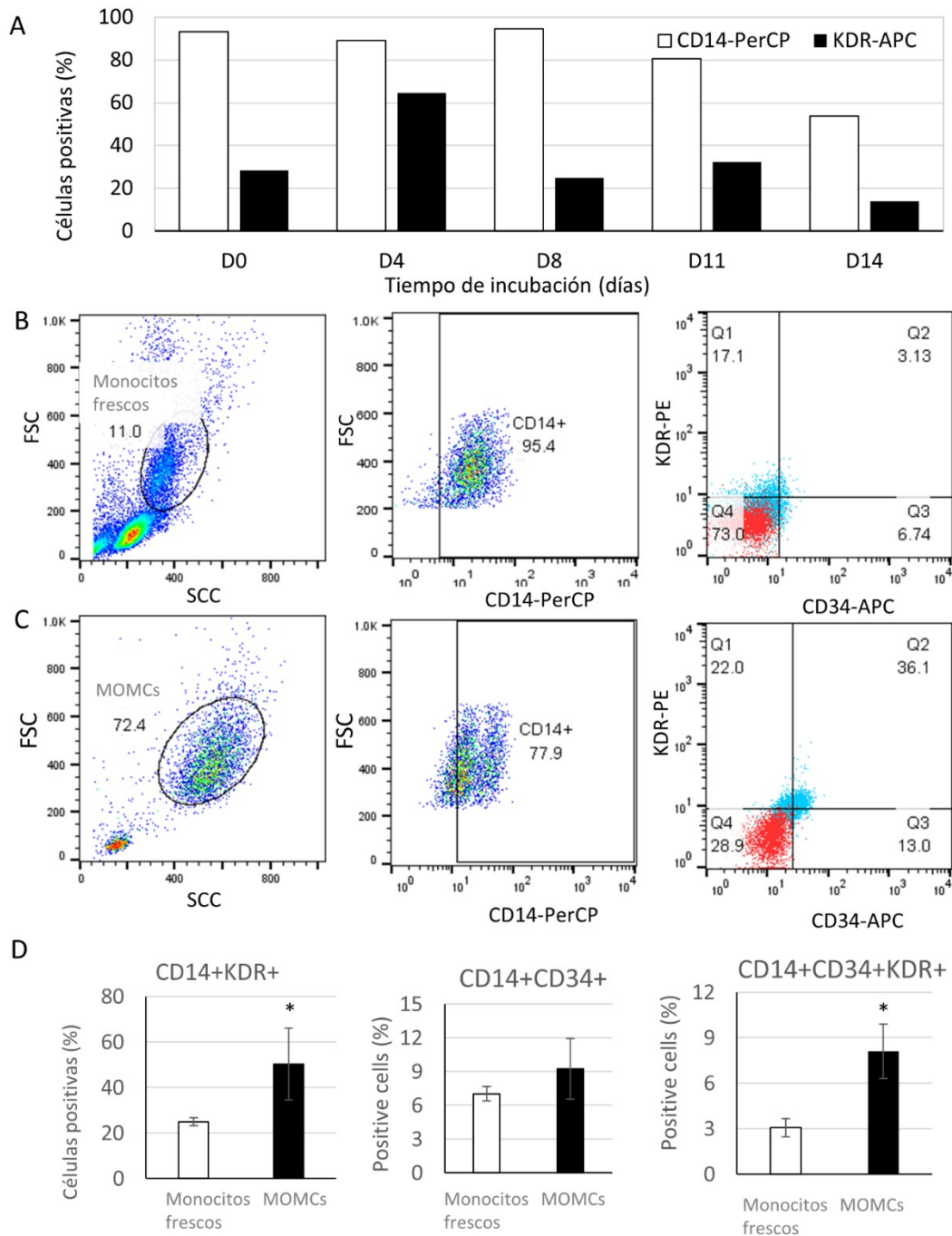


Figura 11. Expresión comparativa de CD14, KDR y CD34 en monocitos frescos y células multipotenciales derivadas de monocitos. A) Monocitos frescos cultivados durante 14 días con medio basal endotelial-2 suplementado con factores de crecimiento vascular (EBM2). B) Expresión de CD14, CD34 y KDR en monocitos frescos mantenidos en RPMI durante 4 días (células control) o en células multipotenciales derivadas de monocitos incubadas con EBM2 (C). D) Expresión comparativa de

*CD14, CD34, y KDR en células multipotenciales derivadas de monocitos vs monocitos frescos durante 4 días, n = 5 ensayos. * $<0,005$ comparado con los monocitos frescos. Color rojo: células sin tinción, color azul: células con tinción para los fluorocromos indicados utilizando anticuerpos anti-CD14-PERCP, anti-CD34-APC y anti-KDR-PE*

10.6. Efecto de las HDLs sobre la diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos a fenotipo endotelial.

El efecto más significativo de las HDLs sobre las células multipotenciales derivadas de monocitos de pacientes con diabetes tipo 2 fue una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de células CD14+KDR+ (de 60.4 % a 46.0%, $p < 0.002$), CD34+ (de 12.7% a 6.1%, $p = 0.020$) y CD14+CD34+KDR+ (de 8.89 % a 4,9%, $p = 0,010$). Este efecto no fue inducido por las HDLs de individuos con prediabetes (Figura 12). No se observaron diferencias en el porcentaje de células que expresaban CD14+ entre los tres grupos (Figura 12).

No se encontró asociación entre las subpoblaciones y el tamaño de las HDLs con cambios en la expresión de KDR. No hubo correlación de la composición macromolecular de las HDLs y la expresión de KDR (colesterol libre: $r=-0.0583$, $p=0.685$; colesterol esterificado: $r=-0.1911$, $p=0.071$; fosfolípidos: $r=-0.1911$, $p=0.179$; y proteína: $r=0.112$, $p=0.433$), excepto una relación directa con los triglicéridos ($r=0.295$, $p=0.034$).

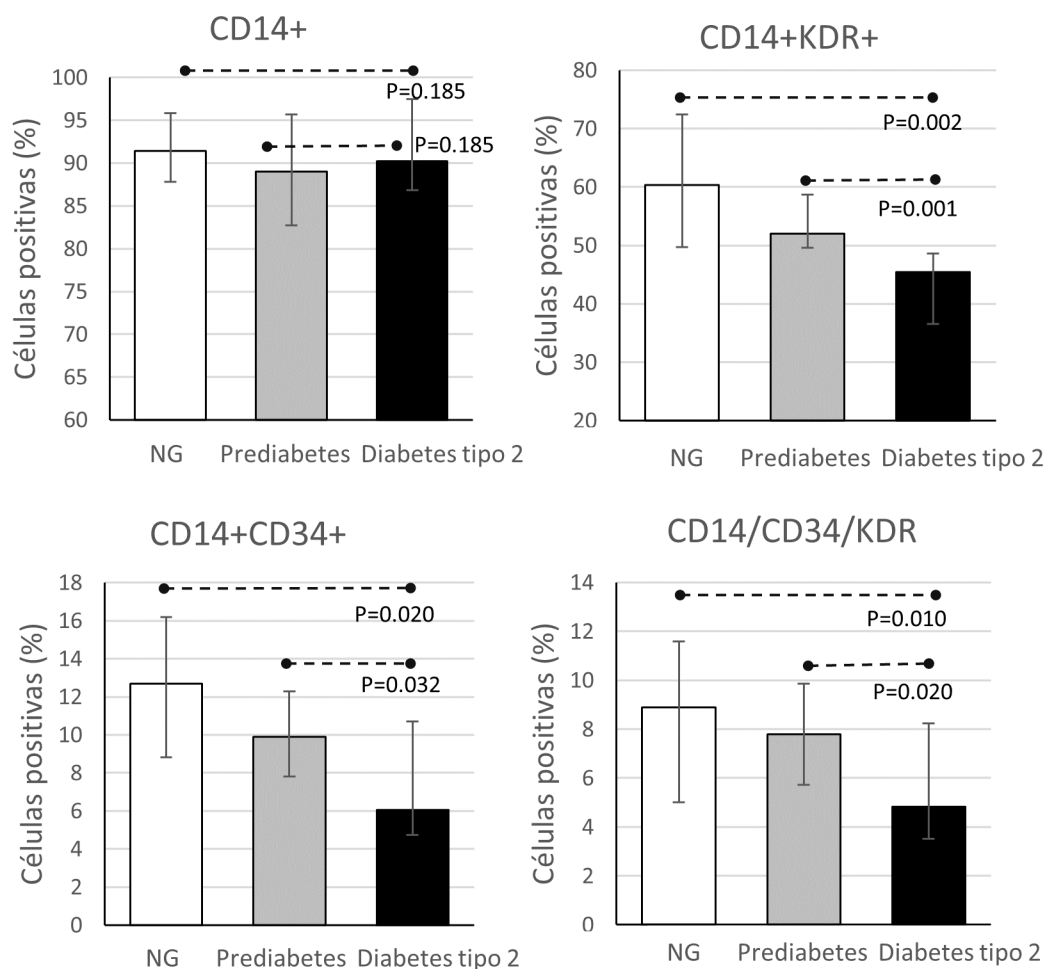


Figura 12. Expresión de marcadores endoteliales en células multipotenciales derivadas de monocitos incubadas con HDLs de los diferentes grupos estudiados. Las células multipotenciales derivadas de monocitos fueron aisladas siguiendo los procedimientos descritos en la Sección de Métodos, y se incubaron con 50 μ g de HDLs durante 45 minutos a las 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, las células se cultivaron en medio basal endotelial suplementado con factores de crecimiento vascular durante 4 días. NG: normoglucémico (n=17); prediabetes (n=18); y diabetes tipo 2: diabetes tipo 2 (n=17). Los valores de p se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Tanto la concentración de fructosamina ($r=-0.289$, $p=0.037$) como los AGEs en HDLs mostraron una correlación inversa y significativa con la expresión de KDR en los diferentes grupos (Figura 13A). La correlación de los AGEs se observó tanto en pacientes normoglucémicos (Figura 13B) como en aquellos con diabetes tipo 2 ($r = -0.606$, $p = 0.009$) (Figura 13D). Sin embargo, no se encontró correlación entre la expresión de KDR y los AGEs en HDLs en individuos con prediabetes (Figura 13C).

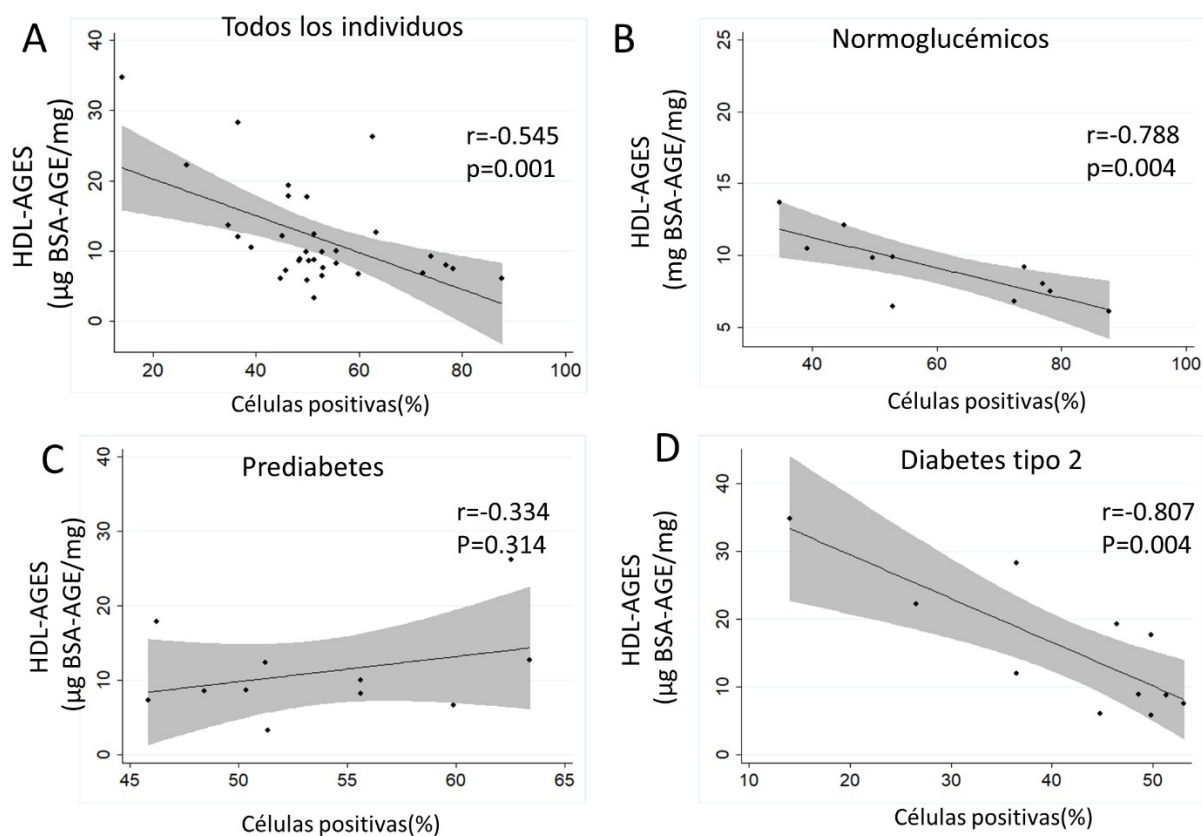


Figura 13. Concentración entre la concentración de AGEs en HDLs y el porcentaje de células CD14+KDR+ en los tres grupos estudiados, $n = 52$ (A), grupo normoglucémico, $n = 17$ (B), grupo con prediabetes, $n = 18$ (C), y diabetes tipo 2, $n = 17$ (D). Los valores de r representan los coeficientes de correlación de Pearson.

11. Discusión

El presente estudio determinó el metabolismo y la estructura química de las HDLs relacionadas con la glicación en dos etapas en la progresión de la diabetes tipo 2. El objetivo principal fue evaluar cómo las características estructurales y de glicación en las HDLs afectan la diferenciación de células vasculares y marcadores de funcionalidad del tejido adiposo. Para ello, se analizaron las HDLs aisladas de pacientes con prediabetes y diabetes tipo 2 de recién diagnóstico, comparándolas con las HDLs de individuos normoglucémicos. Los resultados revelaron una asociación entre las características estructurales de las HDLs y el estado metabólico del tejido adiposo. Mientras que el tamaño de las HDLs se asoció con el marcador sérico ATIR/adiponectina y la inflamación, la concentración de AGEs en las HDLs presentaron la correlación más alta con el índice ATIR. Además, las HDLs de los pacientes con diabetes tipo 2 de recién diagnóstico, redujeron la capacidad de diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos al fenotipo endotelial CD14/KDR/CD34, en comparación con las HDLs de individuos normoglucémicos. Así mismo, se observó una correlación inversa entre los AGEs en HDLs y el número de células positivas CD14/KDR. Estos hallazgos proporcionan una comprensión más profunda del metabolismo de las HDLs y su relación con la disfunción vascular y el tejido adiposo en las etapas tempranas de la diabetes tipo 2.

11.1. HDLs y marcadores de función del tejido adiposo.

La comprensión de los mecanismos que conducen a la disfunción del tejido adiposo no se comprende completamente, ya que se desarrolla en conjunto con comorbilidades como la obesidad y la resistencia a la insulina. Algunos marcadores de disfunción del tejido adiposo podrían ser útiles para predecir el desarrollo de anomalías en las HDLs durante el curso de la diabetes tipo 2. En el presente estudio evaluamos tres marcadores séricos como indicadores de disfunción de tejido adiposo.

En comparación con los sujetos normoglucémicos y con prediabetes, observamos que el índice ATIR fue significativamente mayor, mientras que la relación ATIR/adiponectina estuvo marginalmente elevada entre los sujetos con diabetes tipo 2 recién diagnosticados. El índice ATIR toma en cuenta las concentraciones de ácidos grasos libres e insulina, y refleja la reducción en la capacidad de la insulina de inhibir la secreción de ácidos grasos libres del tejido adiposo (85,86). Por lo tanto, este índice puede identificar a las personas con disfunción del tejido adiposo en las primeras etapas de la diabetes tipo 2. Se ha propuesto que la ATIR puede aumentar progresivamente desde la glucosa de ayuno alterada, la intolerancia a la glucosa hasta la diabetes tipo 2 (89). Esto es consistente con los resultados de nuestro estudio, donde observamos un aumento gradual en el índice ATIR en sujetos con prediabetes y diabetes tipo 2. Por otro lado, nosotros proponemos que la relación ATIR/adiponectina refleja la inflamación y la resistencia a la insulina, pero no se asoció con la diabetes tipo 2, posiblemente debido a las diferencias sutiles en los niveles de adiponectina en plasma entre los grupos (Tabla 3). Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que muestran que los niveles de adiponectina en plasma disminuyen debido principalmente a la presencia de la obesidad y quizás no tanto con el aumento de masa grasa ni la presencia

de diabetes tipo 2 sin obesidad (111,112). Además, se ha reportado que la relación inversa entre la adiponectina con la diabetes tipo 2 podría estar significativamente influenciada por los factores de riesgo asociados a la diabetes tipo 2 y la obesidad (113,114).

Recientemente, se ha puesto énfasis en intervenciones dirigidas a mejorar las concentraciones de adiponectina y leptina, para mejorar el índice adiponectina/leptina, en lugar de enfocarse en cada hormona por separado (81). Además, en pacientes con sobrepeso y obesidad, la pérdida de peso se ha asociado con un aumento significativo en el índice adiponectina/leptina debido a un aumento progresivo de adiponectina y niveles reducidos de leptina (115). En un estudio realizado en pacientes con diabetes tipo 2 que se sometieron a un bypass gástrico en Y de Roux, se encontró que el cambio en el índice de masa corporal y la grasa corporal presentaron la correlación más fuerte con la relación adiponectina/leptina. Sin embargo, los efectos fueron similares entre los sujetos que lograron remisión de la diabetes tipo 2, como en aquellos que no la alcanzaron (116). además, la relación entre estas hormonas se asoció con un primer evento cardiovascular de manera independientemente, mientras que no se observó asociación cuando se evaluaron por separado (117). Esto sugiere que los beneficios cardiovasculares del índice adiponectina/leptina podrían estar relacionados con la reducción del volumen de grasa corporal y los cambios bioquímicos asociados con la reducción de peso (84,116,118).

La heterogeneidad de las HDLs es consecuencia de su proceso de maduración y su metabolismo, el cual involucra la acción concertada de apolipoproteínas, transportadores, enzimas y receptores (14). Nuestros resultados muestran que el tamaño de las HDLs fue gradualmente más pequeño desde la normoglucemia hacia la prediabetes y la diabetes tipo 2. Además, la relación ATIR/adiponectina se asoció de forma independiente con el tamaño de

las HDLs, lo que sugiere que la función del tejido adiposo puede influir en el metabolismo de estas partículas. Se reportado evidencia que muestra una interrelación entre el tejido adiposo y el metabolismo de las HDL (119) . Por un lado, el tejido adiposo puede influir en los niveles de C-HDL mediante la lipólisis y liberación de ácidos grasos libres, que incrementa la concentración de VLDL y el intercambio de triglicéridos por ésteres de colesterol, reduciendo así los niveles de HDL. Además, los adipocitos exportan colesterol hacia las HDLs mediante el eflujo de colesterol (120). Este colesterol puede ser transportado a otros tejidos o al hígado para su catabolismo, contribuyendo a la homeostasis del colesterol. Por otro lado, las HDLs a su vez, inducen un incremento en la expresión de adiponectina en el tejido adiposo de ratones mediante la vía de la fosfatidil inositol quinasa-3 (PI3K) (121). Por lo tanto, los marcadores séricos del tejido adiposo podrían indicar anomalías en las subpoblaciones de las HDLs. Los niveles bajos de adiponectina indican un aumento de la inflamación sistémica de bajo grado que, combinado con el índice ATIR, podría considerarse un marcador de “metainflamación” o inflamación metabólica. Este tipo de inflamación se ha propuesto como el mecanismo inicial de la disfunción del tejido adiposo (122). La acumulación de lípidos junto con la hipoxia y el estrés oxidativo generan señales de daño, que promueven la activación de los macrófagos residentes, los cuales pueden producir citocinas proinflamatorias tales como leptina, IL-6, IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (51). Esto aumenta la infiltración de macrófagos y linfocitos, exacerbando las condiciones inflamatorias. Nuestro estudio encontró una asociación entre la resistina y el PAI-1 con el tamaño de las HDLs. Aunque hay informes de que los adipocitos de ratón producen resistina, existe un debate sobre su relación con la resistencia a la insulina y la obesidad en humanos (123). Sin embargo, existe evidencia clara de que los macrófagos residentes en el tejido adiposo humano secretan resistina cuando hay inflamación crónica de bajo grado, como en la

obesidad y la diabetes tipo 2 (123–125). Además, las altas concentraciones de glucosa, insulina y los ácidos grasos libres inducen la expresión de PAI-1. Los adipocitos humanos también producen PAI-1 en respuesta al TNF- α derivado de los macrófagos del tejido adiposo, lo que demuestra una función del PAI-1 en la inflamación del tejido adiposo (126,127). Por lo tanto, la inflamación metabólica puede contribuir directamente al tamaño de las HDLs, ya que los niveles séricos del PAI-1 están inversamente relacionados con las partículas grandes e intermedias de HDLs en sujetos no diabéticos (128).

En contraste con la asociación observada con el tamaño de las HDLs, la glicación de las partículas se asoció de forma independiente con el índice ATIR y no con el índice ATIR/adiponectina. Aunque el papel ateroprotector de la adiponectina está influenciado por el metabolismo de los lípidos, especialmente la concentración de C-HDL (129,130), la glicación de las HDLs mostró una relación más estrecha con las concentraciones de insulina sérica y el HOMA-IR (Tabla 4). Esto indica un papel relevante de la resistencia a la insulina en las modificaciones por glicación de las HDLs.

11.2. HDLs y la función vascular en la diabetes tipo 2.

Las HDLs son complejos pseudomicelares compuestos por lípidos polares solubilizados por apolipoproteínas (62). Tienen un papel crucial en el transporte reverso del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado y protegen al endotelio de los efectos adversos de LDL oxidadas(131). Además, las HDLs también desempeñan un papel en la protección de las células endoteliales al restaurar la angiogénesis comprometida a través de la diferenciación de células multipotenciales derivadas de monocitos hacia el linaje endotelial (73,97).

Aunque la disfunción endotelial en la diabetes tipo 2 está relacionada con complicaciones vasculares importantes (46,68), los mecanismos subyacentes de este vínculo son complejos. Varias subpoblaciones de células progenitoras participan en la reparación endotelial, incluidos las células multipotenciales derivadas de monocitos, que contribuyen a la restauración vascular a través de su diferenciación en un fenotipo similar a las células endoteliales. Originarios del linaje mieloide, las células multipotenciales derivadas de monocitos exhiben una plasticidad notable, lo que les permite adoptar fenotipos endoteliales caracterizados por la expresión de receptores KDR o Tie-2, conservando al mismo tiempo la expresión de CD14 y CD34 (91–94). Por lo tanto, las células multipotenciales derivadas de monocitos podrían representar una subpoblación crucial de progenitores endoteliales que puede considerarse como un sistema de respuesta rápida contra las agresiones vasculares. las células multipotenciales derivadas de monocitos se incorporan fácilmente en los sitios de lesión, donde aumentan la cantidad de monocitos CD14+/CD16+, estimulando la proliferación de células de la capa media, músculo liso y fibroblastos, que son esenciales en el proceso de cicatrización de heridas (132). El presente estudio muestra que la glicación de HDL puede reducir la expresión de KDR en las células multipotenciales derivadas de monocitos, principalmente en sujetos con diagnóstico reciente de diabetes tipo 2. Además, el análisis de correlación indica que las HDLs glicadas podrían inhibir la diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos debido a su contenido de AGEs. Estos hallazgos están respaldados por estudios que muestran que los AGEs interfieren con la unión y señalización del receptor scavenger de clase B tipo I (133,134), lo que impacta en la angiogénesis relacionada con este receptor (13) y la expresión de KDR (98). Además, también se ha informado que la tasa de diferenciación reducida de las células multipotenciales derivadas de monocitos podría ser el resultado de la regulación negativa de

receptores como los receptores del cassette de unión a ATP tipo 1 y G1 así como del receptor scavenger clase B1, los cuales están mediados por una vía de señalización asociada con el receptor AGEs (78,135).

Los resultados del presente estudio mostraron que las HDL aisladas de sujetos con normoglucemia o prediabetes tienen una concentración similar de productos de glicación. Sin embargo, los datos resaltan que las HDL de personas recién diagnosticadas con diabetes tipo 2 contenían una concentración significativamente mayor de fructosamina y AGEs, lo que refleja los procesos tempranos de glicación en las HDL y tal vez en otras proteínas incluso durante el inicio de la enfermedad. A diferencia de nuestros resultados, un estudio previo informó niveles elevados de glicación en lipoproteínas en personas prediabéticas en comparación con personas normoglucémicas (136). Sin embargo, es importante señalar que existen varias diferencias en las metodologías entre ese análisis y el presente, además de los niveles consistentemente más altos de lipoproteínas glicadas entre los individuos normoglucémicos de ese estudio (136). Además, el presente análisis se realizó en individuos con normoglucemia, prediabetes y diabetes tipo 2 de recién diagnóstico y cuidadosamente seleccionados, en quienes se evitó el tratamiento farmacológico para minimizarlo como factor de confusión. Por otro lado, si bien la asociación de disfunción endotelial y especies lipídicas, como LDL y VLDL, se ha informado previamente en sujetos con prediabetes (68,136), no hay estudios que informen sobre el papel de la glicación de HDL en la función endotelial durante el curso de las primeras etapas de la diabetes.

Más allá de la oxidación de las HDL, que afecta las funciones de las células precursoras endoteliales de una manera dependiente de la dosis (137), las anomalías en la composición de las HDLs afectan otras funciones biológicas. Estas anomalías incluyen una mayor

susceptibilidad a la oxidación debido al enriquecimiento de fosfolípidos (138), el agotamiento de la esfingosina 1 fosfato (S1P) que altera la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (63) y los triglicéridos elevados que comprometen la capacidad de salida de colesterol de las HDLs (60). Además, se conoce que el tamaño pequeño de las HDLs correlaciona con un mayor riesgo cardiovascular (139) y los individuos con resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 se caracterizan por tener un tamaño pequeño de HDLs (140,141). Aunque el presente análisis indica alteraciones mínimas en la mayoría de los componentes de las HDLs, encontramos un tamaño pequeño de las HDLs (Tabla 2) y una correlación significativa del contenido de triglicéridos de las HDL con la expresión de KDR ($r = 0,295$, $p = 0,034$) entre pacientes con diabetes tipo 2 recién diagnosticada. No encontramos correlación directa entre el tamaño de las HDLs y la glicación sus partículas. Sin embargo, se ha informado que la glicación acelera el catabolismo de la ApoA1, lo que sugiere que la glicación de las HDL podría conducir potencialmente a una reducción del tamaño de las HDL en estos pacientes que acaban de identificar la diabetes tipo 2 (76).

11.3 Fortalezas y limitaciones.

Una de las principales fortalezas de este estudio es la caracterización exhaustiva de los sujetos, lo que mitiga los posibles sesgos derivados de comorbilidades y tratamientos asociados. Además, la amplia evaluación de las características estructurales y composición de las HDLs permitió obtener más información sobre los efectos de la diabetes tipo 2 sobre las HDLs y su relación con comorbilidades en etapas tempranas de la enfermedad. El uso de marcadores séricos no invasivos también permitió una evaluación sólida de su relación con el metabolismo de las HDLs.

Sin embargo, el estudio presenta las siguientes limitaciones. En primer lugar, el tamaño de la muestra y el diseño transversal no permiten establecer relaciones causales y puede limitar el poder estadístico para detectar otras asociaciones potenciales. Además, se observaron diferencias marginales en edad, índice de masa corporal y las concentraciones de C-LDL, lo que podría introducir un sesgo en los resultados, aunque en los análisis multivariados se realizó un ajuste por edad e índice de masa corporal, entre otros factores de confusión. Por lo anterior, los hallazgos deben validarse en estudios que involucren una población más grande y a través del tiempo.

Además, las técnicas de evaluación de las HDLs y sus características estructurales requieren tiempo, y las mediciones de AGEs, adiponectina y ácidos grasos libres no están ampliamente disponibles en los laboratorios, lo que limita su utilidad clínica. Estos resultados destacan la necesidad de técnicas actuales estandarizadas (142) y mediciones séricas (86,87), que podrían ser útiles como indicadores del estado de salud del tejido adiposo para prevenir el desarrollo de anomalías metabólicas.

12. Conclusiones

1. Se encontró que el tamaño de las HDLs se asoció negativamente con la relación ATIR/adiponectina y presencia de inflamación, mientras que la concentración de AGEs en las HDLs se correlacionó de manera más significativa con el índice ATIR.
2. En individuos con diabetes tipo 2 recién diagnosticados, se observó una mayor glicación en las HDLs, lo cual resultó en una menor expresión de KDR en las células multipotenciales derivadas de monocitos. Esto indicó una inhibición de su capacidad de diferenciación endotelial. Este efecto no se asoció a la composición o el tamaño de las HDLs.

En general, estos resultados muestran una asociación entre el estado funcional del tejido adiposo y el tamaño y la glicación de las HDLs, las que a su vez afectan negativamente la diferenciación endotelial (Figura 13). Este estudio, destaca la importancia de mantener un control adecuado a largo plazo de los niveles de glucosa, no solo en pacientes con diabetes tipo 2, sino también en individuos con prediabetes, ya que esto puede tener efectos biológicos más allá de las alteraciones en la composición macromolecular o cambios en las subpoblaciones de HDLs.

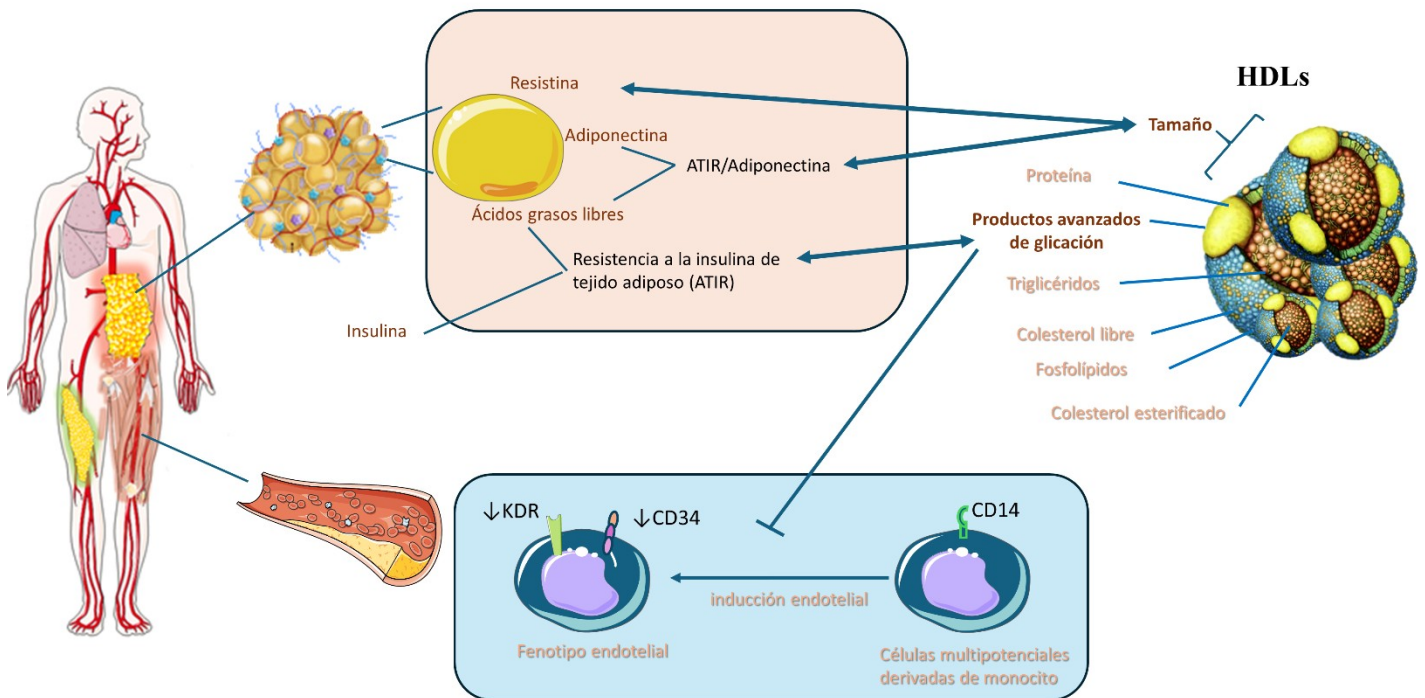


Figura 14. Participación de las alteraciones de las HDLs en la diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos y el estado funcional del tejido adiposo. Mientras que el tamaño de las HDLs correlacionó con la inflamación en tejido adiposo (resistina) y el índice ATIR/adiponectina, Los productos avanzados de glicación (AGEs) se correlacionaron con la resistencia a la insulina del tejido adiposo y la disminución en diferenciación de las células multipotenciales derivadas de monocitos.

13. Referencias Bibliográficas

1. Cooper ID, Brookler KH, Kyriakidou Y, Elliott BT, Crofts CAP. Metabolic Phenotypes and Step by Step Evolution of Type 2 Diabetes: A New Paradigm. *Biomedicines*. 9 de julio de 2021;9(7):800.
2. Su J, Luo Y, Hu S, Tang L, Ouyang S. Advances in Research on Type 2 Diabetes Mellitus Targets and Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci*. 29 de agosto de 2023;24(17):13381.
3. Holt RI, Hanley NA, Al-Lamki MA. *Essential Endocrinology and Diabetes*. Sultan Qaboos Univ Med J. agosto de 2007;7(2):97-8.
4. Ozougwu, C J, Obimba, C K, Belonwu, D C, et al. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *JPAP*. 30 de septiembre de 2013;4(4):46-57.
5. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 126(1):12-22.
6. Stöckli J, Meoli CC, Hoffman NJ, Fazakerley DJ, Pant H, Cleasby ME, et al. The RabGAP TBC1D1 plays a central role in exercise-regulated glucose metabolism in skeletal muscle. *Diabetes*. junio de 2015;64(6):1914-22.
7. Alberry B, Silveira PP. Brain insulin signaling as a potential mediator of early life adversity effects on physical and mental health. *Neurosci Biobehav Rev*. octubre de 2023;153:105350.
8. Kim BH, Joo Y, Kim MS, Choe HK, Tong Q, Kwon O. Effects of Intermittent Fasting on the Circulating Levels and Circadian Rhythms of Hormones. *Endocrinol Metab (Seoul)*. agosto de 2021;36(4):745-56.
9. DeFronzo RA. The Triumvirate: β -Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1 de junio de 1988;37(6):667-87.

10. Bayol SA, Bruce CR, Wadley GD. Growing healthy muscles to optimise metabolic health into adult life. *J Dev Orig Health Dis.* diciembre de 2014;5(6):420-34.
11. Laurens C, Grundler F, Damiot A, Chery I, Le Maho AL, Zahariev A, et al. Is muscle and protein loss relevant in long-term fasting in healthy men? A prospective trial on physiological adaptations. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* diciembre de 2021;12(6):1690-703.
12. Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *American Journal of Cardiology.* 21 de diciembre de 2000;86(12):5-10.
13. Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 1 de agosto de 2014;103(3):350-61.
14. Thomas SR, Zhang Y, Rye KA. The pleiotropic effects of high-density lipoproteins and apolipoprotein A-I. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 12 de agosto de 2022;101689.
15. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med.* octubre de 2011;17(10):594-603.
16. Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G. Understanding high-density lipoprotein function in disease: recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. *Prog Lipid Res.* octubre de 2014;56:36-46.
17. Martagon AJ, Zubirán R, González-Arellanes R, Praget-Bracamontes S, Rivera-Alcántara JA, Aguilar-Salinas CA. HDL abnormalities in type 2 diabetes: Clinical implications. *Atherosclerosis.* 3 de agosto de 2023;117213.
18. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport: Basic Mechanisms and their Roles in Vascular Health and Disease. *Circ Res.* 10 de mayo de 2019;124(10):1505-18.

19. Herold J, Kalucka J. Angiogenesis in Adipose Tissue: The Interplay Between Adipose and Endothelial Cells. *Front Physiol* [Internet]. 9 de febrero de 2021 [citado 2 de abril de 2024];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2020.624903/full>
20. Lopez-Yus M, Hörndler C, Borlan S, Bernal-Monterde V, Arbones-Mainar JM. Unraveling Adipose Tissue Dysfunction: Molecular Mechanisms, Novel Biomarkers, and Therapeutic Targets for Liver Fat Deposition. *Cells*. 22 de febrero de 2024;13(5):380.
21. Porro S, Genchi VA, Cignarelli A, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F, et al. Dysmetabolic adipose tissue in obesity: morphological and functional characteristics of adipose stem cells and mature adipocytes in healthy and unhealthy obese subjects. *J Endocrinol Invest*. mayo de 2021;44(5):921-41.
22. van Meijel RLJ, Blaak EE, Goossens GH. Chapter 1 - Adipose tissue metabolism and inflammation in obesity. En: Johnston RA, Suratt BT, editores. *Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 4 de marzo de 2023]. p. 1-22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128135532000014>
23. Authors/Task Force Members, Ryden L, Standl E, Bartnik M, Berghe GV d., Betteridge J, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: full text: The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European Heart Journal Supplements*. 1 de junio de 2007;9(Suppl C):C3-74.
24. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. febrero de 2017;66(2):241-55.
25. Tobin GS, Cavaghan MK, Hoogwerf BJ, McGill JB. Addition of exenatide twice daily to basal insulin for the treatment of type 2 diabetes: clinical studies and practical approaches to therapy. *Int J Clin Pract*. diciembre de 2012;66(12):1147-57.

26. Tricò D, Natali A, Arslanian S, Mari A, Ferrannini E. Identification, pathophysiology, and clinical implications of primary insulin hypersecretion in nondiabetic adults and adolescents. *JCI Insight*. 3(24):e124912.
27. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. septiembre de 1999;104(6):787-94.
28. Ha J, Sherman A. Type 2 diabetes: one disease, many pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1 de agosto de 2020;319(2):E410-26.
29. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*. 24 de marzo de 2012;379(9821):1142-54.
30. Thomas DD, Corkey BE, Istfan NW, Apovian CM. Hyperinsulinemia: An Early Indicator of Metabolic Dysfunction. *J Endocr Soc*. 1 de septiembre de 2019;3(9):1727-47.
31. Johnson JD. On the causal relationships between hyperinsulinaemia, insulin resistance, obesity and dysglycaemia in type 2 diabetes. *Diabetologia*. octubre de 2021;64(10):2138-46.
32. Gelfand JM, Wan MT. Psoriasis: a novel risk factor for type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. diciembre de 2018;6(12):919-21.
33. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 16 de junio de 2012;379(9833):2279-90.
34. Jalali M, Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F, Hosseinpanah F. Severity of adipose tissue dysfunction is associated with progression of pre-diabetes to type 2 diabetes: the Tehran Lipid and Glucose Study. *BMC Public Health*. 9 de enero de 2024;24(1):121.
35. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-27.

36. Gillett MJ. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Clin Biochem Rev.* noviembre de 2009;30(4):197-200.
37. Faerch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A. Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia.* septiembre de 2009;52(9):1714-23.
38. Edelstein SL, Knowler WC, Bain RP, Andres R, Barrett-Connor EL, Dowse GK, et al. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: an analysis of six prospective studies. *Diabetes.* abril de 1997;46(4):701-10.
39. Solis-Herrera C, Triplitt C, Cersosimo E, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. En: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editores. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000 [citado 10 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/>
40. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* noviembre de 2008;10 Suppl 4:32-42.
41. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J.* febrero de 2016;92(1084):63-9.
42. Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, et al. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab.* enero de 2006;3(1):47-58.
43. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 23 de julio de 2015;1:15019.
44. Lopaschuk GD, Verma S. Mechanisms of Cardiovascular Benefits of Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: A State-of-the-Art Review. *JACC Basic Transl Sci.* junio de 2020;5(6):632-44.

45. Salehi M, Purnell JQ. The Role of Glucagon-Like Peptide-1 in Energy Homeostasis. *Metab Syndr Relat Disord*. mayo de 2019;17(4):183-91.
46. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010;53(7):1270-87.
47. Garber AJ. Obesity and type 2 diabetes: which patients are at risk? *Diabetes Obes Metab*. mayo de 2012;14(5):399-408.
48. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA*. 19 de septiembre de 2012;308(11):1150-9.
49. Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J*. julio de 2006;20(9):1540-2.
50. Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtscher M, Pramsohler S, Pesta D. Hypoxia, Oxidative Stress and Fat. *Biomolecules*. junio de 2015;5(2):1143-50.
51. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. marzo de 2007;92(3):1023-33.
52. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr Physiol*. 13 de diciembre de 2018;9(1):1-58.
53. O'Rourke RW. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. *Surg Obes Relat Dis*. noviembre de 2018;14(11):1755-63.
54. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. diciembre de 2003;112(12):1796-808.

55. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 20 de octubre de 2009;120(16):1640-5.
56. Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. junio de 2004;27(6):1496-504.
57. Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance. *Clin Cornerstone*. 2006;8 Suppl 1:S21-27.
58. Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia. *Metabolism*. diciembre de 2014;63(12):1469-79.
59. Musunuru K. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids*. octubre de 2010;45(10):907-14.
60. Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *J Lipid Res*. agosto de 2002;43(8):1264-74.
61. Woudberg NJ, Pedretti S, Lecour S, Schulz R, Vuilleumier N, James RW, et al. Pharmacological Intervention to Modulate HDL: What Do We Target? *Front Pharmacol*. 22 de enero de 2018;8:989.
62. Kontush A, Chapman MJ. Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Curr Diab Rep*. febrero de 2008;8(1):51-9.
63. Denimal D, Monier S, Bouillet B, Vergès B, Duvillard L. High-Density Lipoprotein Alterations in Type 2 Diabetes and Obesity. *Metabolites*. 9 de febrero de 2023;13(2):253.
64. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*. marzo de 2010;11(1):61-74.

65. Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis.* diciembre de 2014;25(8):713-24.
66. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* agosto de 2001;12(4):383-9.
67. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci.* septiembre de 2015;30(9):1213-25.
68. Su Y, Liu XM, Sun YM, Jin HB, Fu R, Wang YY, et al. The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. *Int J Clin Pract.* junio de 2008;62(6):877-82.
69. Stolar M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* marzo de 2010;123(3 Suppl):S3-11.
70. Yu B, Chen Q, Le Bras A, Zhang L, Xu Q. Vascular Stem/Progenitor Cell Migration and Differentiation in Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 10 de julio de 2018;29(2):219-35.
71. Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry A.* enero de 2009;75(1):25-37.
72. Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med.* junio de 2007;56(2):41-7.
73. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami Y, Ikeda Y. Endothelial Differentiation Potential of Human Monocyte-Derived Multipotential Cells. *STEM CELLS.* 1 de diciembre de 2006;24(12):2733-43.
74. Rye KA, Barter PJ. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res.* 3 de enero de 2014;114(1):143-56.

75. Bonizzi A, Piuri G, Corsi F, Cazzola R, Mazzucchelli S. HDL Dysfunctionality: Clinical Relevance of Quality Rather Than Quantity. *Biomedicines*. 25 de junio de 2021;9(7):729.
76. Kashyap SR, Osme A, Ilchenko S, Golizeh M, Lee K, Wang S, et al. Glycation Reduces the Stability of ApoAI and Increases HDL Dysfunction in Diet-Controlled Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 de febrero de 2018;103(2):388-96.
77. Ravi R, Ragavachetty Nagaraj N, Subramaniam Rajesh B. Effect of advanced glycation end product on paraoxonase 2 expression: Its impact on endoplasmic reticulum stress and inflammation in HUVECs. *Life Sciences*. 1 de abril de 2020;246:117397.
78. Daffu G, Shen X, Senatus L, Thiagarajan D, Abedini A, Hurtado Del Pozo C, et al. RAGE Suppresses ABCG1-Mediated Macrophage Cholesterol Efflux in Diabetes. *Diabetes*. diciembre de 2015;64(12):4046-60.
79. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. junio de 2007;48(6):1253-62.
80. Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes*. 15 de noviembre de 2016;7(19):483-514.
81. Zhao S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res*. 8 de enero de 2021;128(1):136-49.
82. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Ramírez B, Becerril S, Salvador J, et al. Adiponectin-leptin Ratio is a Functional Biomarker of Adipose Tissue Inflammation. *Nutrients*. 22 de febrero de 2019;11(2):E454.
83. Zaletel J, Barlovic DP, Prezelj J. Adiponectin-leptin ratio: a useful estimate of insulin resistance in patients with Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. septiembre de 2010;33(8):514-8.

84. Gl V, Sm G. Metabolic risk susceptibility in men is partially related to adiponectin/leptin ratio. *Journal of obesity* [Internet]. 2013 [citado 19 de octubre de 2022];2013. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23533722/>
85. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest*. julio de 1989;84(1):205-13.
86. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, Webb A, Hardies J, Darland C, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. mayo de 2012;55(5):1389-97.
87. Gastaldelli A, Harrison SA, Belfort-Aguilar R, Hardies LJ, Balas B, Schenker S, et al. Importance of changes in adipose tissue insulin resistance to histological response during thiazolidinedione treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. octubre de 2009;50(4):1087-93.
88. Jorge-Galarza E, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Cardoso-Saldaña G, Vargas-Alarcón G, et al. Adipose tissue dysfunction increases fatty liver association with pre diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8:73.
89. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes*. abril de 2017;66(4):815-22.
90. Juárez-Rojas JG, Torre-Villalvazo I, Medina-Urrutia AX, Reyes-Barrera J, Sainz-Escárrega VH, Posadas-Romero C, et al. Participation of white adipose tissue dysfunction on circulating HDL cholesterol and HDL particle size in apparently healthy humans. *International Journal of Obesity*. 2020;44(4):920-8.
91. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood «endothelial progenitor cells» are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 4 de marzo de 2003;107(8):1164-9.

92. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, et al. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol.* noviembre de 2003;74(5):833-45.
93. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* febrero de 2004;24(2):288-93.
94. Chopra H, Hung MK, Kwong DL, Zhang CF, Pow EHN. Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and Prospects. *Stem Cells Int.* 2018;2018:9847015.
95. Lucchesi D, Popa SG, Sancho V, Giusti L, Garofolo M, Daniele G, et al. Influence of high density lipoprotein cholesterol levels on circulating monocytic angiogenic cells functions in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 5 de junio de 2018;17(1):78.
96. Jin F, Hagemann N, Sun L, Wu J, Doeppner TR, Dai Y, et al. High-density lipoprotein (HDL) promotes angiogenesis via S1P3-dependent VEGFR2 activation. *Angiogenesis.* mayo de 2018;21(2):381-94.
97. Primer KR, Psaltis PJ, Tan JTM, Bursill CA. The Role of High-Density Lipoproteins in Endothelial Cell Metabolism and Diabetes-Impaired Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 21 de mayo de 2020;21(10):E3633.
98. Li HM, Mo ZW, Peng YM, Li Y, Dai WP, Yuan HY, et al. Angiogenic and Antiangiogenic mechanisms of high density lipoprotein from healthy subjects and coronary artery diseases patients. *Redox Biol.* septiembre de 2020;36:101642.
99. Li Y, Zhao M, He D, Zhao X, Zhang W, Wei L, et al. HDL in diabetic nephropathy has less effect in endothelial repairing than diabetes without complications. *Lipids Health Dis* [Internet]. 14 de abril de 2016 [citado 19 de septiembre de 2017];15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4831084/>

100. Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, Bahlmann FH, et al. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*. 5 de enero de 2010;121(1):110-22.
101. Tinajero MG, Malik VS. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am*. septiembre de 2021;50(3):337-55.
102. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health*. marzo de 2020;10(1):107-11.
103. Basto-Abreu A, Barrientos-Gutiérrez T, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, López-Olmedo N, De la Cruz-Góngora V, et al. [Prevalence of diabetes and poor glycemic control in Mexico: results from Ensanut 2016.]. *Salud Publica Mex*. febrero de 2020;62(1):50-9.
104. ENCUESTAS [Internet]. [citado 26 de junio de 2023]. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>
105. Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Romero-Martínez M, Castro-Porras L, Gómez-Velasco D, Mehta R. Trends in the prevalence of metabolic syndrome and its components in Mexican adults, 2006-2018. *Salud Publica Mex*. 5 de noviembre de 2021;63(6, Nov-Dic):713-24.
106. DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *JAMA*. 7 de noviembre de 1986;256(17):2372-7.
107. Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Martínez-Alvarado R, Jorge-Galarza E, Posadas-Sánchez R, Cardoso-Saldaña G, et al. High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and C-reactive protein. *Atherosclerosis*. diciembre de 2008;201(2):392-7.

108. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 24 de septiembre de 1981;665(3):408-19.
109. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem*. 25 de abril de 1987;262(12):5488-91.
110. Juárez-Rojas J, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, Jorge-Galarza E, Mendoza-Pérez E, Caracas-Portilla N, et al. High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus. *Lupus*. noviembre de 2008;17(11):981-7.
111. Al-Hamodi Z, Al-Habori M, Al-Meerri A, Saif-Ali R. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):99.
112. Hansen D, Dendale P, Beelen M, Jonkers RAM, Mullens A, Corluy L, et al. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol*. junio de 2010;109(3):397-404.
113. Hong X, Zhang X, You L, Li F, Lian H, Wang J, et al. Association between adiponectin and newly diagnosed type 2 diabetes in population with the clustering of obesity, dyslipidaemia and hypertension: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 24 de febrero de 2023;13(2):e060377.
114. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 8 de julio de 2009;302(2):179-88.
115. Magkos F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, Kelly SC, et al. Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab*. 12 de abril de 2016;23(4):591-601.
116. Unamuno X, Izaguirre M, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Becerril S, et al. Increase of the Adiponectin/Leptin Ratio in Patients with Obesity and Type 2 Diabetes after Roux-en-Y Gastric Bypass. *Nutrients*. 3 de septiembre de 2019;11(9):E2069.

117. Kappelle PJWH, Dullaart RPF, van Beek AP, Hillege HL, Wolffenbuttel BHR. The plasma leptin/adiponectin ratio predicts first cardiovascular event in men: a prospective nested case-control study. *Eur J Intern Med.* diciembre de 2012;23(8):755-9.
118. Rafey MF, Abdalgwad R, O'Shea PM, Foy S, Claffey B, Davenport C, et al. Changes in the Leptin to Adiponectin Ratio Are Proportional to Weight Loss After Meal Replacement in Adults With Severe Obesity. *Front Nutr.* 2022;9:845574.
119. Zhang T, Chen J, Tang X, Luo Q, Xu D, Yu B. Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein: new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 16 de diciembre de 2019;18(1):223.
120. Sun R, Fang P, Jiang J, Huang C, Wang J, Guo Q, et al. Insulin Rescued MCP-1-Suppressed Cholesterol Efflux to Large HDL2 Particles via ABCA1, ABCG1, SR-BI and PI3K/Akt Activation in Adipocytes. *Cardiovasc Drugs Ther.* agosto de 2022;36(4):665-78.
121. Linthout SV, Foryst-Ludwig A, Spillmann F, Peng J, Feng Y, Meloni M, et al. Impact of HDL on adipose tissue metabolism and adiponectin expression. *Atherosclerosis.* 1 de junio de 2010;210(2):438-44.
122. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 de marzo de 2021;320(3):C375-91.
123. Taouis M, Benomar Y. Is resistin the master link between inflammation and inflammation-related chronic diseases? *Mol Cell Endocrinol.* 1 de agosto de 2021;533:111341.
124. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* octubre de 2001;50(10):2199-202.
125. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* junio de 2011;121(6):2111-7.

126. Sawdey MS, Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest.* octubre de 1991;88(4):1346-53.
127. Wang L, Chen L, Liu Z, Liu Y, Luo M, Chen N, et al. PAI-1 Exacerbates White Adipose Tissue Dysfunction and Metabolic Dysregulation in High Fat Diet-Induced Obesity. *Front Pharmacol.* 2018;9:1087.
128. Somodi S, Seres I, Lőrincz H, Harangi M, Fülöp P, Paragh G. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Level Correlates with Lipoprotein Subfractions in Obese Nondiabetic Subjects. *Int J Endocrinol.* 2018;2018:9596054.
129. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA.* 14 de abril de 2004;291(14):1730-7.
130. Hafiane A, Gasbarrino K, Daskalopoulou SS. The role of adiponectin in cholesterol efflux and HDL biogenesis and metabolism. *Metabolism.* 2019;100:153953.
131. Valente AJ, Irimpen AM, Siebenlist U, Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med.* mayo de 2014;70:117-28.
132. Nasiri B, Yi T, Wu Y, Smith RJ, Podder AK, Breuer CK, et al. Monocyte Recruitment for Vascular Tissue Regeneration. *Adv Healthc Mater.* noviembre de 2022;11(22):e2200890.
133. Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med.* agosto de 2002;12(6):258-62.
134. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, et al. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 20 de abril de 2001;276(16):13348-55.

135. Nagata H, Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, et al. AGEs inhibit scavenger receptor class B type I gene expression via Smad1 in HUVECs. *J Mol Endocrinol*. 1 de febrero de 2021;
136. Al Saudi RM, Kasabri V, Naffa R, Bulatova N, Bustanji Y. Glycated LDL-C and glycated HDL-C in association with adiposity, blood and atherogenicity indices in metabolic syndrome patients with and without prediabetes. *Ther Adv Endocrinol Metab*. octubre de 2018;9(10):311-23.
137. Wu J, He Z, Gao X, Wu F, Ding R, Ren Y, et al. Oxidized high-density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells' function by activation of CD36-MAPK-TSP-1 pathways. *Antioxid Redox Signal*. 1 de febrero de 2015;22(4):308-24.
138. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*. junio de 2004;45(6):993-1007.
139. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després JP, Hovingh GK, Stroes ESG, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med*. 20 de enero de 2009;150(2):84-93.
140. Medina-Bravo P, Medina-Urrutia A, Juárez-Rojas JG, Cardoso-Saldaña G, Jorge-Galarza E, Posadas-Sánchez R, et al. Glycemic control and high-density lipoprotein characteristics in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. septiembre de 2013;14(6):399-406.
141. Juárez-Rojas JG, Torre-Villalvazo I, Medina-Urrutia AX, Reyes-Barrera J, Sainz-Escárrega VH, Posadas-Romero C, et al. Participation of white adipose tissue dysfunction on circulating HDL cholesterol and HDL particle size in apparently healthy humans. *International Journal of Obesity [Internet]*. 2 de diciembre de 2019; Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0493-y>
142. Zhang W, Jin J, Zhang H, Zhu Y, Dong Q, Sun J, et al. The value of HDL subfractions in predicting cardiovascular outcomes in untreated, diabetic patients with stable coronary

artery disease: An age- and gender-matched case-control study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1041555.

RESEARCH

Open Access



Adipose tissue dysfunction serum markers are associated with high density lipoprotein size and glycation in the early stages of type 2 diabetes

Esteban Jorge-Galarza^{1,2,3}, Aida Medina-Urrutia¹, Juan Reyes-Barrera¹, Margarita Torres-Tamayo¹, Luis Felipe Montaña-Estrada², Araceli Pérez-Arenas⁴, Felipe Massó-Rojas⁴ and Juan Gabriel Juárez-Rojas^{1*}

Abstract

Background High-density lipoproteins (HDLs) have antiatherogenic properties related to their chemical structure. Adipose tissue (AT) influences HDL reverse cholesterol transport and plasma HDL cholesterol levels. However, whether AT dysfunction affects HDL subpopulations and their glycation in early type 2 diabetes (T2D) is still unknown.

Objective To investigate the association of inflammation and AT dysfunction serum markers with the size and glycation of HDLs in normoglycemic, prediabetes, and T2D subjects.

Methods We assessed HDL particle size and advanced glycation end-product (AGE) content in HDLs isolated from normoglycemic (n = 17), prediabetes (n = 17), and recently T2D-diagnosed (n = 18) subjects. Insulin, adiponectin, and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) were determined using the Bio-Rad Multiplex Platform, and free fatty acids (FFAs) and high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were determined by standard procedures. The AT insulin resistance (ATIR) index and ATIR/adiponectin and adiponectin/leptin ratios were calculated.

Results HDL was progressively smaller (nm) and enriched with AGE (mg-BSA-AGE/mg protein) according to the glucose categories: 8.49 and 7.5 in normoglycemic subjects, 8.44 and 12.4 in prediabetic subjects, and 8.32 and 14.3 in T2D subjects ($P=0.033$ and $P=0.009$ for size and AGE, respectively). In multivariable regression analysis, the ATIR/adiponectin ratio was inversely associated with HDL size ($\beta = -0.257$, $P=0.046$), and the ATIR ratio was directly associated with HDL glycation ($\beta = 0.387$, $P=0.036$). In contrast, adiponectin and the adiponectin/leptin ratio were not associated with alterations in HDL particles. Furthermore, HDL size was associated with resistin ($\beta = -0.348$, $P=0.007$) and PAI-1 ($\beta = -0.324$, $P=0.004$). HDL and AGE were related to insulin concentrations ($\beta = 0.458$, $P=0.015$). Analyses were adjusted for age, sex, body mass index, triglycerides, and HDL-cholesterol.

Conclusion HDL size was significantly associated with the ATIR/adiponectin ratio and inflammation, whereas glycation was more strongly related to the ATIR index. These findings have important implications for the management and prevention of cardiovascular disease in T2D patients.

*Correspondence:
Juan Gabriel Juárez-Rojas
gaboyk2@gmail.com

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords Type 2 diabetes, High-density lipoproteins, Adipose tissue dysfunction, Advanced glycation end products, And high-density lipoprotein size

Background

Beyond its role as an energy reservoir, white adipose tissue (AT) is a metabolically active endocrine organ that regulates blood lipid levels, blood pressure, inflammation, and angiogenesis [1]. This tissue can expand by increasing the cell number (hyperplasia) and/or size (hypertrophy) of mature adipocytes [2]. In a chronic condition of excessive energy intake, adipocytes can reach a critical cell size. A larger average size of adipocytes accompanied by lower oxygen tension (hypoxia) is usually observed in the adipose tissue of obese subjects compared to lean subjects [3, 4].

The convergence of hypoxia, insulin resistance, and low-grade chronic inflammation contributes to AT dysfunction, characterized by a shift in the adipocyte secretory profile toward a proinflammatory phenotype. Hypertrophic adipocytes can produce cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukins 6 (IL-6) and 8 (IL-8), and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [5], which have proinflammatory action and induce immune cells such as macrophages and T cells. In this microenvironment, adipocytes reduce adiponectin and increase leptin and resistin secretion [6]. These cellular stress responses can drive adipocytes into apoptosis if the conditions persist [7].

Adiponectin is a pleiotropic hormone derived from adipocytes and has anti-inflammatory, antidiabetic, and antiatherogenic properties [8]. The serum concentration of this adipocytokine is decreased in the metabolically unhealthy obese phenotype compared to the metabolically obese healthy phenotype or normal-weight individuals [9]. Therefore, it is considered a good marker of AT quality [10]. On the other hand, leptin regulates physiological energy processes through satiety, increasing energy expenditure and promoting adipose tissue lipolysis. Although leptin concentrations increase with increasing fat volume, elevated levels of this hormone are associated with insulin resistance [11], inflammation, and AT lipolysis, probably through resistance to its catabolic effects [2, 12]. Based on the above information, the adiponectin/leptin ratio has been proposed as a useful clinical marker to identify adipose tissue dysfunction [8, 13]. This index has been shown to be a strong marker of insulin resistance, even better than the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), quantitative insulin sensitivity check index, or fasting insulin plasma levels [14]. In addition, the index has been related to abnormal concentrations of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides. The latter effect was independent of body mass index (BMI), and its

association was stronger than with adiponectin or leptin serum levels [15]. The AT insulin resistance index (ATIR) is another marker of adipose tissue quality that reflects the metabolic dysregulation of lipolysis and can be easily estimated by the serum levels of insulin multiplied by free fatty acids (FFAs) [16, 17]. This ratio has been associated with nonalcoholic fatty liver disease [16], insulin resistance, impaired fasting glucose, and early type 2 diabetes mellitus (T2D) [18, 19].

High-density lipoproteins (HDLs) are heterogeneous complexes varying in shape, size, and lipid and protein content. Because of their antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic, antithrombotic, and vasodilatory properties, these lipoproteins are considered atheroprotective. Furthermore, they can also promote cholesterol efflux from the macrophages of the subendothelial region, which prevents atherosclerosis development [20]. Previously, it has been reported that HDL subfractions leading to a smaller size are related to cardiovascular risk conditions, including T2D [21]. Moreover, triglyceride enrichment, cholesterol ester depletion, and HDL glycation are changes commonly found in T2D patients [22]. There is mounting evidence showing an interrelationship between adipose tissue and HDL metabolism, as adipocytes can play an active role in regulating total cholesterol balance and HDL production [23]. We previously reported that subjects with adipose tissue dysfunction, as determined by the combination of low adiponectin and elevated ATIR values, had smaller estimated HDL sizes [24]. The purpose of this study was to assess the association of inflammation and AT dysfunction serum markers with HDL size and the glycation of these particles in normoglycemic, prediabetic, and T2D subjects.

Materials and methods

The studied population included a convenience sample of subjects from the control arm of the Genetics of Atherosclerosis Disease Study [24] and employees of the *Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez*, considering the following inclusion criteria: men and women aged 40 to 60 years, BMI ≤ 33 kg/m², a previous fasting plasma glucose measurement, and those who did not self-report a personal history of cardiovascular, kidney, liver, or thyroid disease. Subjects under hypolipidemic and antihypertensive treatment were excluded. Elimination criteria included liver enzyme levels three times above the reference values for our population (aspartate aminotransferase (AST) > 126 IU/L and alanine aminotransferase (ALT) > 123 IU/L), triglycerides > 6.78 mmol/L (which can interfere with LDL-C calculation) and high-sensitivity

C-reactive protein (hs-CRP) values >10 mg/L to discard the presence of a possible acute inflammatory process. The final sample was stratified according to the American Diabetes Association [25] as follows: (1) normoglycemic (n=18), with fasting glucose values <5.6 mmol/L and plasma glucose <7.8 mmol/L measured after 2 h of 75 g of oral glucose intake (oral glucose tolerance test [OGTT]); (2) prediabetes (n=17), with fasting glucose values 5.6–6.9 mmol/L or glucose 7.8–11 mmol/L after OGTT; and (3) T2D (n=18) included newly diagnosed patients with less than four years of evolution and those with fasting glucose values >6.9 mmol/L or glucose >11 mmol/L after OGTT. Seven T2D subjects were under metformin treatment, and two of them also received DPP4 inhibitors. To minimize possible bias due to pharmacological treatment, T2D patients suspended medication 72 h before the study under physician surveillance and continued treatment after the study. The Ethics and Research Committee of the *Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez* approved the study.

After fasting for 12 h, 20 mL of blood was collected to obtain plasma and serum. Blood samples were separated and immediately frozen at -80 °C until analysis. Total cholesterol, HDL-C, fasting glucose, triglycerides, apolipoprotein A1 (ApoA1), apolipoprotein B-100 (ApoB-100), hemoglobin A1C (HbA1C), AST, ALT, creatinine, and hs-CRP were determined by standard procedures with an automated analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The interassay coefficient of variation was less than 6% in all determinations. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated according to Delong et al. [26]. The glomerular filtration rate (GFR) was estimated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula. Insulin, adiponectin, leptin, resistin, C-peptide, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were determined using the Bio-Plex Multiplex Immunoassay System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US). Serum-free fatty acids (FFAs) were determined with an enzymatic colorimetry assay (Wako Diagnostics, Osaka, Japan) with an interassay coefficient <3%. The following serum markers were considered indicators of adipose tissue functionality: ATIR, calculated with the following formula: $ATIR = FFA \text{ (mmol/L)} \times \text{Insulin concentrations } (\mu\text{IU/L})$ [16, 18]. ATIR/adiponectin index and adiponectin/leptin ratio.

HDL characterization

HDLs were isolated from the plasma by sequential ultracentrifugation using a potassium bromide solution (0.5 g/L EDTA) at a 1.21 g/mL density [27]. Total HDLs were dialyzed against PBS (10 mM, pH 7.4) and loaded onto a 4–25% native polyacrylamide gel to estimate the average size of HDL and the subclasses HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, and HDL3c. The gels were analyzed by

densitometry to express the subclasses in a relative proportion to 100%. HDL glycation of early (fructosamine), intermediate (dicarbonyls), and advanced glycation end products (AGEs) was determined. Fructosamine was quantified using colorimetric reagents in an automated autoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Dicarbonyls were determined as previously reported [28]. Briefly, the isolated HDLs were incubated with 2–4 dinitrophenyl-phenylhydrazine in 2.5 N HCl for 60 min at 25 °C and precipitated with 20% trichloroacetic acid (*w/v*). The pellet was dissolved in 6 M HCl-guanidine and incubated for 10 min at 37 °C to quantify the absorbance at 370 nm using a Biotek Synergy H1 spectrophotometer (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). The AGE concentration in HDL was quantified using a commercial competitive ELISA kit (OxiSelect™ STA-817, Cell Biolabs, Inc. San Diego, CA, USA). This method identifies carboxymethyl lysine and pentosidine adducts.

Statistical analyses

For the present study, a sample size estimation analysis using HDL size as the primary variable [29], with a power of 80% and a confidence interval of 95%, was performed. The analysis indicated the need for 16 subjects to detect significant differences among the study groups. Continuous variables were evaluated for normality and expressed as the mean \pm standard deviation or median (interquartile range), as appropriate. Categorical variables were reported as the number of subjects and their prevalence. Differences in means were compared using analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction for multiple comparisons. The Kruskal–Wallis test was used to compare medians, and the chi-square test was used to analyze prevalence values. Correlations were evaluated by univariate linear regression, calculating the standardized beta coefficient. Model 1 was adjusted for age and sex; model 2 corresponded to model 1 plus BMI, HDL-C, and triglycerides. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using Stata 12 IC software (StataCorp LLC, College Station, TX, USA).

Results

The clinical and biochemical features of the participants are summarized in Table 1. There was no statistically significant difference between groups in age, sex proportion, prevalence of smoking, plasma concentration of total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, ApoA1, ApoB-100, AST, ALT, and glomerular filtration rate. BMI was slightly higher in the prediabetic group than in the normoglycemic group ($28.6 \pm 4 \text{ kg/m}^2$ vs. $25.3 \pm 3 \text{ kg/m}^2$, $P < 0.063$) and almost identical to that in the diabetic group ($27.6 \pm 4.6 \text{ kg/m}^2$). As expected, HbA1c values were significantly higher in the prediabetic (5.82%) and

Table 1 Clinical and metabolic characteristics of the studied groups

	Normo-glycemic n=17	Prediabe-tes n=17	T2D n=18	P value
Age (years)	48.5±6.3	52±6.7	49.4±7.5	0.295
Sex (male/female)	7/10	6/11	8/10	0.461
BMI (kg/m ²)	25.3±3.2	28.6±4.2	27.6±4.6	0.063
Smoking (%)	3 (17.7)	3 (17.7)	2 (11.1)	0.824
Hemoglobin A1C (%)	5.47 (5.2–5.6)	5.82 (5.7–5.9) *	6.6 (6.5–7.2) *†	<0.001
Fasting Glucose (mmol/L)	4.86 (4.7–5.3)	5.61 (5.3–5.8) *	6.94 (5.9–8.2) *†	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.91±1.03	5.43±1.4	4.56±1.1	0.113
LDL cholesterol (mmol/L)	3.05 (2.6–3.6)	3.54 (2.9–4.0)	2.66 (2.3–3.2)	0.075
HDL cholesterol (mmol/L)	1.28±0.34	1.19±0.31	1.01±0.34	0.059
Triglycerides (mmol/L)	1.27 (0.89–1.62)	1.69 (1.23–2.0)	1.74 (1.4–2.07) *	0.075
ApoA1 (g/L)	1.44±0.22	1.39±0.21	1.33±0.26	0.399
ApoB-100 (g/L)	1.08±0.29	1.24±0.35	1.1±0.26	0.557
AST (IU/L)	20 (17–25)	21 (17–23)	22 (17–25)	0.951
ALT (IU/L)	22 (15–39)	20 (16–26)	25 (20–35)	0.404
GFR (mL·min ⁻¹ ·1.73m ²)	100 (85–104)	99 (93–102)	103 (84–109)	0.944

Values are expressed as the mean±standard deviation, median (interquartile range), or number of subjects (%). HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase. GFR: glomerular filtration rate. * $P<0.05$ vs. normoglycemic, † $P<0.05$ vs. prediabetes; P value for means was calculated using ANOVA with Bonferroni correction. The Kruskal–Wallis test was used to compare medians, and the chi-square test was used to analyze prevalence values

diabetes (6.6%) groups than in the normoglycemic (5.47%) group ($P<0.001$).

Among the AT dysfunction serum markers, ATIR and ATIR/adiponectin were higher in the abnormal glucose groups than in the normoglycemic group, with a significant difference in the T2D group (Table 2). Adiponectin and the adiponectin/leptin ratio showed a trend toward lower values in the abnormal glucose groups. On the other hand, insulin, HOMA-IR, and the ratio HOMA-IR/adiponectin were significantly higher in the T2D group than in the control group. Other glucose metabolism markers and inflammation molecules were not significantly different among groups.

HDL size was significantly smaller in T2D subjects than in the prediabetic and normoglycemic individuals (8.32 nm vs. 8.44 and 8.49 nm, respectively, $P=0.033$) due to a lower proportion of HDL2a and an increase in HDL3c in the T2D individuals (Table 3). In addition, HDLs had a higher glycation tendency, especially in AGE content, with values of 7.5, 12.4, and 14.3 (mg-BSA-AGE/

Table 2 Markers of adipose tissue dysfunction, glucose, and inflammation in the studied groups

	Normo-glycemic n=17	Prediabe-tes n=17	T2D n=18	P value
<i>AT dysfunction markers</i>				
ATIR	4.12±2.5	5.96±2.8	7.85±4.6 *	0.009
ATIR/adiponectin	0.52 (0.12–0.7)	0.74 (0.3–1.22)	1.1 (0.55–1.9) *	0.047
Adiponectin/leptin	4.22 (1.4–13.3)	2.8 (1.4–6.1)	2.4 (1.31–5)	0.564
Adiponectin (µg/mL)	8.48 (5.8–26)	8.99 (4.3–18)	7.0 (4.5–17)	0.808
<i>Glucose and lipid me-tabolism markers</i>				
Insulin (µIU/mL)	5.97 (5.3–10.8)	9.97 (6.7–13) *	12 (8.1–18) *	0.027
HOMA-IR	1.28 (1.1–2.2)	2.5 (1.6–3.4) *	3.8 (2.8–6.2) *†	<0.001
HOMA-IR/Adiponectin	0.15 (0.04–0.40)	0.32 (0.1–0.43)	0.70 (0.20–1.4) *	0.029
C-Peptide (pg/mL)	607±259	663±241	790±415	0.391
Leptin (ng/mL)	2.58 (0.8–6.1)	4.6 (3.0–6.1)	3.1 (0.92–4.3)	0.265
FFA (mmol/L)	0.56±0.18	0.59±0.14	0.61±0.2	0.544
<i>Inflammatory markers</i>				
Resistin (ng/mL)	3.8±1.4	3.5±0.7	3.6±1.3	0.822
PAI-1 (ng/mL)	7.4±2.6	7.1±2.3	7.6±2.1	0.809
hs-CRP (mg/L)	1.41 (0.8–2.2)	1.02 (0.7–1.6)	1.6 (0.92–5.0)	0.504

Values are expressed as the mean±standard deviation, median (interquartile range)

* $P<0.05$ vs. normoglycemic, † $P<0.05$ vs. prediabetes. ATIR: adipose tissue insulin resistance. HOMA-IR: homeostasis model of assessment-insulin resistance; FFA: free fatty acids. PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1. hsCRP: high sensitivity C-reactive protein; P value for means was calculated using ANOVA with Bonferroni correction. The Kruskal–Wallis test was used to compare medians

mg protein) in normoglycemic, prediabetic, and T2D individuals, respectively ($P=0.009$).

Simple correlations of HDL size and HDL glycation are shown in Figs. 1 and 2, respectively. After adjusting for age, sex, and BMI, HDL size was inversely associated with the ATIR/adiponectin ratio, HOMA/adiponectin ratio, resistin, and PAI-1 and directly associated with HDL-C levels (Table 4, model 1). With further adjustment for HDL-C and triglycerides, the correlations remained significant (Table 4, model 2). In contrast, HDL-AGE was directly correlated with ATIR, the ATIR/adiponectin ratio, insulin, HOMA-IR and HOMA-IR/adiponectin ratio (Table 4, model 1). With further adjustment for HDL-C and triglycerides, the association remained for ATIR, insulin, and HOMA-IR (Table 4, model 2).

Table 3 HDL subpopulations and glycation according to the studied groups

	Normo-glycemic n=17	Prediabetes n=17	T2D n=18	P value
<i>HDL subpopulations</i>				
HDL2b (%)	8.5 ± 3.6	7.7 ± 2.7	6.2 ± 2.6	0.074
HDL2a (%)	17.2 ± 3.7	15.2 ± 4.3	13.4 ± 5.1 *	0.047
HDL3a (%)	23.2 ± 2.3	24.0 ± 2.4 *	21.2 ± 4.4 †	0.033
HDL3b (%)	25.4 ± 2.6	27.0 ± 2.5	26.4 ± 2.7	0.224
HDL3c (%)	25.8 ± 6.9	26.9 ± 5.8	32.8 ± 11 *	0.028
HDL mean diameter (nm)	8.49 ± 0.20	8.44 ± 0.17	8.32 ± 0.20 *	0.033
<i>HDL glycation</i>				
HDL- fructosamine	4.55 ± 0.79	4.67 ± 0.85	5.18 ± 1.1	0.139
HDL- carbonyls	96.4 ± 22	98.5 ± 29	102.3 ± 24	0.824
HDL-AGE	7.5 (6.8–9.9)	12.4 (8.2–16.3)	14.3 (8.8–19) *†	0.009

Values are expressed as the mean ± standard deviation, median (interquartile range)

* P < 0.05 vs. normoglycemic, † p < 0.05 vs. prediabetes. The P value for means was calculated by ANOVA with Bonferroni correction, and that for medians was calculated by the Kruskal–Wallis test. HDL: high density lipoproteins; AGE: advanced glycation products

Discussion

In the natural history of T2D, the presence of adipose tissue dysfunction can affect HDL metabolism and its chemical structure due to persistent glycation. Our findings show that the ATIR/adiponectin ratio was independently associated with HDL glycation and its subpopulations, whereas ATIR alone was significantly associated with the AGEs concentration in HDLs. On the other hand, inflammatory indicators, such as resistin and PAI-1 were independently associated with HDL size. These data show for the first time that adipose tissue dysfunction, as measured by serum markers, affects the size and glycation of HDL particles in the early T2D status and could have implications for managing and preventing cardiovascular disease.

Mechanisms leading to AT dysfunction are not fully understood because this condition develops alongside comorbidities, such as obesity and insulin resistance. Some AT dysfunction markers could predict the development of HDLs abnormalities in T2D. In the present work, we evaluated three serum markers as indicators of AT dysfunction. Compared to normoglycemic and prediabetic subjects, the ATIR index was significantly higher, whereas the ATIR/adiponectin ratio was marginally higher in subjects with abnormal glucose metabolism. Because the ATIR index considers FFAs and insulin concentrations, it reflects the altered adipose tissue antilipolytic effect of insulin [17]. Thus, the index can identify individuals with AT dysfunction during the early stages of T2D. It has been proposed that ATIR could progressively increase across categories of altered glucose

metabolism, from impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance to T2D. [19] The above agrees with the results of the present study, as we observed a gradual increase in the ATIR index in subjects with prediabetes and T2D. Although the ATIR/adiponectin ratio reflects inflammation and insulin resistance, it was not associated with T2D, possibly because the difference in adiponectin levels between groups is very subtle (Table 2). Our results align with previous works reporting that plasma adiponectin levels are more related to fat mass excess than the presence of T2D without obesity [30].

Recent interventions have sought to increase the adiponectin/leptin index rather than specifically targeting leptin or adiponectin [8]. Moreover, in patients with overweight and obesity, weight loss is associated with a significant elevation of that index due to a progressive elevation of adiponectin and reduced leptin levels [31]. Recently, in 25 T2D patients who underwent Roux-en-Y gastric bypass, the change in BMI and body fat had the strongest correlation with the adiponectin/leptin ratio. However, this improvement was similar among subjects who had or did not have remission of T2D, indicating that the cardiovascular benefits of the adiponectin/leptin ratio could be due to a reduction in body fat volume or biochemical changes associated with weight reduction [32].

The HDL heterogeneity is a consequence of the maturation process of HDL metabolism, which includes the concerted action of apolipoproteins, transporters, enzymes, and receptors [20]. The present results show that HDL size gradually decreased from normoglycemia to prediabetes and T2D. Furthermore, the ATIR/adiponectin ratio was independently associated with HDL size, indicating that adipose tissue function may influence the metabolism of HDL particles. Previous research has reported evidence of the potential contribution of adipose tissue to HDL metabolism, indicating its ability to maintain cholesterol homeostasis by promoting cholesterol efflux to HDL. In addition, HDL induces the expression of adiponectin through the phosphatidylinositol kinase-3 (PI3K) pathway in abdominal fat adipocytes [23, 33]. Hence, adipose tissue serum markers may indicate abnormalities in the HDLs subpopulations. The adiponectin levels indicate an increase in low-grade systemic inflammation, which, combined with the ATIR index, could be considered a marker of metaflammation. This type of inflammation has been proposed as the initial mechanism of adipose tissue dysfunction [10]. Nutrient surplus may trigger inflammation by inducing an increase in the number and size of adipocytes. When hypertrophic adipocytes predominate, their size correlates with increased inflammatory adipokine secretion, including leptin, IL-6, IL-8, and MCP-1 [34]. The latter increases the infiltration of macrophages and lymphocytes, exacerbating

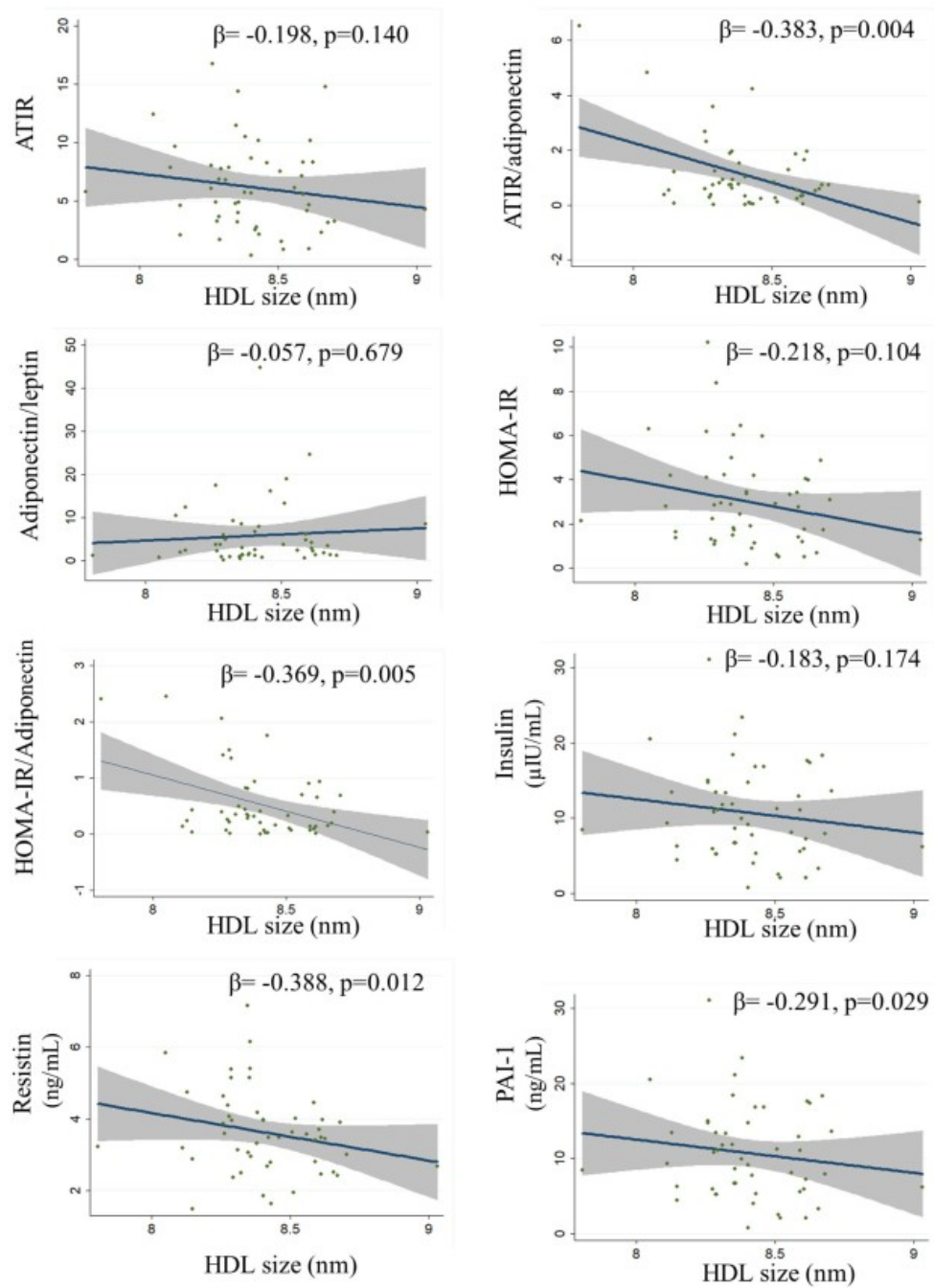


Fig. 1 Correlations of HDL size with adipose tissue dysfunction serum markers and inflammation. Analyses were made for the whole population. Values are expressed as standardized beta coefficients in univariable regression. ATIR: adipose tissue insulin resistance. HOMA-IR; homeostasis model of assessment-insulin resistance; PAI-1; plasminogen activator inhibitor-1

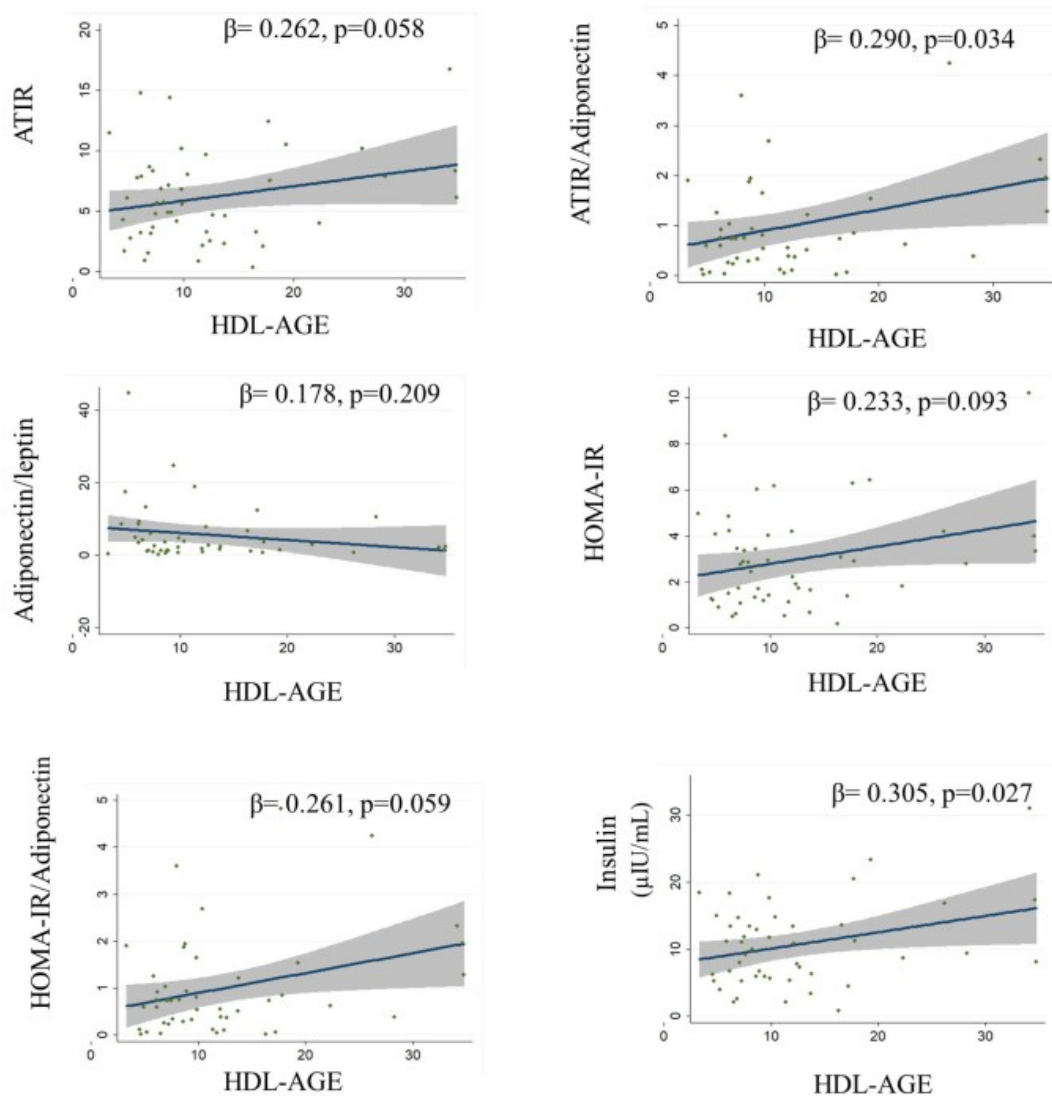


Fig. 2 Correlations of HDL-AGE with adipose tissue dysfunction serum markers and inflammation. Analyses were made for the whole population. Values are expressed as the standardized beta coefficient in univariable regression. ATIR: adipose tissue insulin resistance. HOMA-IR, homeostasis model of assessment-insulin resistance; PAI-1; plasminogen activator inhibitor-1

proinflammatory conditions. This scenario is consistent with the findings of our work, in which we found an association of resistin and PAI-1 with HDL size. Although there are reports that mouse adipocytes produce resistin, a debate about its link to insulin resistance and human obesity is ongoing. However, it has been clearly shown that human adipose tissue-resident macrophages secrete resistin when chronic low-grade inflammation is

present, such as in obesity and T2D [35]. Likewise, high concentrations of glucose, insulin, and FFAs induce the expression of PAI-1 [36]. In addition, human adipocytes produce PAI-1 in response to TNF- α derived from adipose tissue macrophages, demonstrating a role for PAI-1 in adipose tissue inflammation [37, 38]. Therefore, metabolic inflammation could contribute directly to HDL size,

Table 4 Association of AT dysfunction serum markers, glucose metabolism markers, and inflammation with HDL characteristics

	HDL size (nm)		^a HDL-AGE (mg-BSA-AGE/mg protein)	
	Model 1	Model 2	Model 1	Model 2
<i>AT dysfunction markers</i>				
ATIR	-0.137		0.339*	0.380*
ATIR/adiponectin	-0.387*	-0.281*	0.286*	
Adiponectin/leptin	0.044		-0.212	
Adiponectin (µg/mL)	0.097		-0.238	
<i>Glucose and lipid metabolism</i>				
Insulin (µIU/mL)	-0.137		0.448*	0.463*
HOMA-IR	-0.236		0.309*	0.315*
HOMA-IR/Adiponectin	-0.382*	-0.261*	0.294*	
HDL-Cholesterol (mmol/L)	0.466*	0.544*	-0.137	
Triglycerides (mmol/L)	-0.025		0.025	
FFA (mmol/L)	-0.027		0.061	
<i>Inflammation markers</i>				
Resistin (ng/mL)	-0.329*	-0.304*	0.096	
PAI-1 (ng/mL)	-0.331*	-0.370*	-0.006	
hs-CRP (mg/L)	-0.077		0.212	

Values are expressed as standardized beta coefficients. *p<0.005. a) n=48 for the analysis with HDL-AGE. ATIR: adipose tissue insulin resistance. HOMA-IR: homeostasis model of assessment-insulin resistance; FFA: free fatty acids. PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1. hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein
Model 1: adjusted for age, sex, and BMI.
Model 2: adjusted for age, sex, BMI, HDL-C, and triglycerides

as serum PAI-1 levels are inversely related to large and intermediate HDL particles in nondiabetic subjects [39].

Compared to our study, a previous report found higher AGE concentrations in subjects with prediabetes [40]. Although there are substantial differences in the sampling method, the values reported in that study were too high, even for subjects with T2D. In this study, patients had a short time since diagnosis (less than four years) and were not receiving pharmacological treatment. In contrast to the observed association with HDL size, glycation of the particles was independently associated with the ATIR and not with the ATIR/adiponectin ratio. Although the atheroprotective role of adiponectin is influenced by lipid metabolism, especially the HDL-C concentration [41], HDL glycation could be due mainly to serum insulin concentrations, which had the strongest association in the multivariable analyses (Table 4).

Study strengths and limitations

One of the main strengths of this study is the thorough characterization of the subjects, which mitigates potential biases resulting from comorbidities and associated treatments. Moreover, this comprehensive approach facilitated the utilization of non-invasive and practical markers specific to adipose tissue, enabling a robust evaluation of its relationship with HDL metabolism.

This study poses limitations represented by the small sample size and the cross-sectional design, which precludes causal inference and may limit statistical power to detect other potential associations. Therefore, the present study should be considered an exploratory analysis, and the findings should be validated in a study involving a larger population. Assessing HDLs and its structural characteristics are time-consuming techniques, and adiponectin and FFAs measurements are not widely available in laboratories, thereby limiting their clinical utility. These results underline the need for standardized current techniques [42] and serum measurements [10, 16, 17] that could be useful as indicators of adipose tissue health status to prevent the development of metabolic abnormalities.

Conclusion

The HDL size was associated with the ATIR/adiponectin ratio and inflammation, whereas AGEs concentration in HDLs was associated more strongly with the ATIR index. These results suggest that adipose tissue dysfunction could influence HDLs metabolism and integrity. Our findings have important implications for managing and preventing cardiovascular disease in T2D patients.

Abbreviations

- AT Adipose tissue
- HDL High-density lipoproteins
- T2D Type 2 diabetes
- AGE Advanced glycation end-products
- FFA Free fatty acids
- PAI-1 Plasminogen activator inhibitor 1
- ATIR Adipose tissue insulin resistance
- TNF-alpha Tumor necrosis factor alfa
- IL-6 Interleukin 6
- IL-8 Interleukin 8
- MCP-1 Monocyte chemoattractant protein 1
- HOMA-IR Homeostatic model assessment of insulin resistance
- BMI Body mass index
- hs-CRP High-sensitive C reactive protein
- AST Aspartate aminotransferase
- ALT Alanine aminotransferase
- ApoA1 Apolipoprotein A1
- ApoB-100 Apolipoprotein B-100
- HbA1C Hemoglobin A1C
- LDL-C Low-density lipoprotein cholesterol
- HDL-C High-density lipoprotein cholesterol
- GFR Glomerular filtration rate

Authors' contributions

E.J.G. and J.G.J.R., conceptualization, manuscript writing, and critical review and revision. J.R.B, A.M.U, A.P.A., M.T.T. researched data, interpreted the results, and provided critical review. L.F.M. and F.M.R. provided a critical review and contributed to the discussion. E.J.G. and J.G.J.R. are the guarantors of this work and take responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. Esteban Jorge Galarza is a student in the Biological Sciences Doctoral Program, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM, for its initials in Spanish), Mexico.

Funding

Open access funding for this article was supported by the *Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez*.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Competing interest

The authors have nothing to disclose.

Ethics approval and consent to participate

The protocol was approved by the Ethics and Research Committees of the *National Institute of Cardiology*, based on the Declaration of Helsinki. All subjects gave their informed consent to participate in this study.

Author details

¹Departamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

²Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

15. Frithioff-Bøjsøe C, Lund MAV, Lausten-Thomsen U, Hedley PL, Pedersen O, Christiansen M, et al. Leptin, adiponectin, and their ratio as markers of insulin resistance and cardiometabolic risk in childhood obesity. *Pediatr Diabetes*. 2020;21:194–202.
16. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, Webb A, Hardies J, Darland C, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55:1389–97. <https://doi.org/10.1002/hep.25539>.
17. Gastaldelli A, Harrison SA, Belfort-Aguilar R, Hardies LJ, Balas B, Schenker S, et al. Importance of changes in adipose tissue insulin resistance to histological response during thiazolidinedione treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50:1087–93.
18. Jorge-Galarza E, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Cardoso-Saldaña G, Vargas-Alarcón G, et al. Adipose tissue dysfunction increases fatty liver association with pre diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. Volume 8. *Diabetology & metabolic syndrome*. Springer; 2016. pp. 1–8.
19. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the San Antonio

15. Anexo II. Artículo enviado

1 Endothelial differentiation of multipotential monocyte-derived cells is inhibited by glycated high-
2 density lipoproteins in early type 2 diabetes.

3 Esteban Jorge-Galarza^{1,2,3}

4 Felipe Massó-Rojas.⁴

5 Araceli Páez-Arenas⁴

6 Aida Medina-Urrutia³

7 Margarita Torres-Tamayo³

8 Juan Gabriel Juárez-Rojas³

9 Rafael Nambo-Venegas⁵

10 Ana María Mejía Domínguez⁶

11 Juan Pablo Reyes Grajeda⁵

12 Emma Rodríguez Maldonado⁴

13 Luis Felipe Montaña Estrada¹

14

15 ¹Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina,
16 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico.

17 ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México
18 (UNAM), Mexico City, Mexico.

19 ³Endocrinology Department, National Institute of Cardiology Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico.

20 ⁴Laboratory of Translational Medicine, UNAM-INC Research Unit, National Institute of Cardiology
21 Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico.

22 ⁵Laboratory of Chronic Diseases Biochemistry, National Genomics Medicine Institute
23 (INMEGEN) Mexico City, Mexico.

24 ⁶Blood Bank, National Institute of Cardiology “Ignacio Chávez”, Mexico City, Mexico.

25 Running title: Monocyte-derived multipotential cells differentiation and type 2 diabetes

26

27 Corresponding author:

28 Luis Felipe Montaña Estrada. Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Biología Celular y

29 Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma (UNAM). Ap. Postal 70-159, México

30 045 10, Mexico City, Mexico, email address: lfmontmx@unam.mx

31

32 **Summary**

33

34 Background: Multipotential monocyte-derived cells (MOMCs) undergo endothelial lineage
35 differentiation in response to angiogenic stimuli. High-density lipoproteins (HDLs) are known to rescue
36 impaired angiogenesis in diabetes. However, it remains unclear whether glycated HDLs affect MOMCs
37 differentiation in early type 2 diabetes (T2D),

38 Rationale: We hypothesize that glycation, size, and macromolecular composition of HDLs affect
39 MOMCs differentiation into the endothelial phenotype, in both prediabetes and T2D patients.

40 Methods: HDLs were isolated from normoglycemic, prediabetes, and T2D individuals using density
41 sequential ultracentrifugation. Early and intermediate glycation products levels in HDLs were assessed
42 through standard biochemical methods, while advanced glycation end products (AGEs) were determined
43 using competitive ELISA Kits. The size and macromolecular composition of HDLs particles were also
44 analyzed. CD14⁺ MOMCs were isolated from peripheral blood mononuclear cells obtained from blood
45 bank donors and cultured on fibronectin-coated plates. Flow cytometry was employed to evaluate CD14,
46 CD34, and KDR endothelial cell differentiation markers after MOMCs incubation with HDLs.

47 Results: Normoglycemic and prediabetes individuals had lower early glycation products in HDLs (4.6
48 and 4.4 mM/mg, respectively) than T2D patients (5.2 mM/mg, $p=0.049$). AGEs concentration exhibited

2

49 a similar trend (7.7, 8.7, and 14.3 mg-BSA-AGEs/mg of protein; $p < 0.02$). HDLs size was higher in
50 normoglycemic and prediabetes individuals (8.51 and 8.44 nm, respectively) compared to T2D patients
51 (8.32 nm, $p < 0.002$). HDLs macromolecular composition was not significantly different among groups.
52 The expression of CD14/KDR and CD14/CD34/KDR in MOMCs incubated with HDLs from T2D
53 patients was lower compared to that observed in normoglycemic and prediabetes individuals. AGEs
54 concentration in HDLs inversely correlates with CD14/KDR positive cells ($r = -0.473$, $p < 0.001$),
55 especially among T2D patients ($r = -0.606$, $p = 0.009$).
56 Conclusion: Highly glycosylated HDLs from T2D patients inhibit MOMCs differentiation into the
57 endothelium phenotype beyond macromolecular composition and size. Our results underscore the
58 importance of maintaining adequate and long-term glucose control, relevant not only in T2D patients but
59 also in those with prediabetes.
60 Keywords: Newly diagnosed type 2 diabetes, high-density lipoproteins, endothelial progenitor cells,
61 advanced glycation products, high-density lipoprotein size.

62
63

64 **Introduction**

65 Type 2 diabetes (T2D) represents a prevalent metabolic disorder characterized by elevated fasting
66 glucose, triglycerides, small low-density lipoproteins, and low high-density lipoprotein cholesterol
67 (HDL-C) levels, which significantly increased cardiovascular risk [1]. These metabolic abnormalities
68 often begin during the diabetes onset, when fasting glucose levels are moderately below the T2D
69 threshold. Nevertheless, nearly 70% of those individuals with prediabetes will progress to established T2D
70 [2].

71 High-density lipoproteins (HDLs) are macromolecular compounds mainly involved in cholesterol
72 reverse transport. These particles exhibit a wide heterogeneity in shape, size and composition, which in

3

73 turn impacts their antiatherogenic properties such as cholesterol efflux, and their antioxidant, anti-
74 inflammatory, antiapoptotic, antithrombotic, and vasodilatory activity [3]. Moreover, these HDLs
75 functions have been shown to be compromised in T2D patients. T2D leads to HDLs tryglycerides-
76 enrichment and esterified cholesterol depletion, resulting in small and oxidized HDLs particles [4, 5].
77 Additionally, chronic hyperglycemia associated with T2D can induce non-enzymatic glycation, leading
78 to the formation of various glycation products, including Amadori's products (such as fructosamine),
79 carbonylated proteins like glyoxal and methylglyoxal, and more complex molecules know as advanced
80 glycation end products (AGEs). Theses glycation products have been shown to impair the beneficial
81 properties of HDLs particles [6, 7 Bansal 2023].

82 In healthy conditions, the intricated mechanism underlying endothelial repair involves late and early
83 endothelial progenitor cells (EPCs). Late EPCs have the full capability to undergo angiogenesis, whereas
84 early EPCs have a more heterogeneous subpopulations, are more abundant, and have a higher endocrine
85 secretory activity than late EPCs [9]. Multipotential monocyte-derived cells (MOMCs) represent an early
86 EPC subpopulation characterized by CD14 expression, myeloid origin, and engaging in vascular
87 restoration [10, 11, 12]. Due to their higher concentration in the bloodstream, as well as their plasticity
88 to differentiate into an endothelium-like phenotype, MOMCs could be a promising candidate for
89 regenerative medicine approaches (44, 45).

90 Endothelial dysfunction in T2D patients promotes vascular complications such as nephropathy or
91 cardiomyopathy [1,8]. HDLs play a crucial role in promoting angiogenesis [13, 14] and can also rescue
92 impaired angiogenesis in T2D [15]. However, HDLs from T2D patients have been found to disturb the
93 development of late and early EPC [16, 17] and fail to induce carotid repair in animal models [18].
94 Although evidence has suggested that HDLs affectations derived from diabetes could be attributed to
95 HDLs-protein composition (Gomes Kjerulf 2020), there is no data analyzing the effect of moderately
96 high glucose levels on HDLs glycation and its impact on EPC development. Therefore, the present study

97 aimed to investigate whether glycation, size, and macromolecular composition of HDLs isolated from
98 patients with prediabetes and newly diagnosed T2D affect the MOMCs differentiation into the
99 endothelial phenotype.

100 **Methods**

101

102 Study participants

103 The study included individuals from the control group of the Genetics of Atherosclerotic Disease study
104 [19] and employees from the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez in Mexico City, Mexico.

105 Participants met the following inclusion criteria: men and women aged 40 to 60 years old, with a previous
106 fasting plasma glucose measurement, a body mass index $<33 \text{ kg/m}^2$, and no personal history or diagnosis
107 of cardiovascular, liver, kidney, or thyroid disease. Individuals under hypolipidemic and antihypertensive
108 treatment were excluded. Participants were categorized into three groups following the American
109 Diabetes Association [2] criteria: 1) the normoglycemic group, consisting in twenty subjects with fasting
110 glucose $< 100 \text{ mg/dl}$ and glucose $< 140 \text{ mg/dl}$ 2-hour after the oral glucose tolerant test (OGTT, 74 g of
111 oral glucose intake); 2) the prediabetes group, comprising twenty individuals with fasting glucose 100-
112 125 mg/dL or glucose 140-199 mg/dL, 2-hour post OGTT, and 3) newly diagnosed type 2 diabetes
113 patients with less than 3 years of evolution and fasting glucose $> 125 \text{ mg/dL}$ or glucose $\geq 200 \text{ mg/dL}$ 2-
114 hour post OGTT. Participants with aspartate aminotransferase [AST] levels greater than 126 IU/L,
115 alanine aminotransferase [ALT] levels greater than 123 IU/L, triglyceride levels greater than 600 mg/dL,
116 or high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels greater than 10 mg/L were eliminated from the
117 study. Written informed consent was obtained from all participants, and the Ethics and Research
118 Commission of the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez approved the project.

119 After a 12-h overnight fast, 20 mL EDTA blood samples were drawn and centrifuged within 15 minutes
120 of collection. Plasma was separated, aliquoted, and immediately analyzed or frozen at -80°C until

121 analysis. Plasma glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, hemoglobin A1C,
122 apolipoprotein A1, apolipoprotein B-100, hs-CRP, ALT and AST were measured using standardized
123 procedures (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Inter-assay coefficients of variation were
124 less than 6% for all assays. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was estimated using the Delong
125 et al. method [20]. The glomerular filtration rate (eGFR), was computed with the Chronic Kidney Disease
126 Epidemiology Collaboration formula.

127 **Biochemical analyses**

128 HDLs characterization.

129 HDLs were isolated from the individual plasma by sequential ultracentrifugation based on their density,
130 ranging from 1.063 to 1.21 g/mL. This isolation was achieved using a potassium bromide solution with
131 EDTA at a concentration of 0.5 g/L, followed by exhaustive dialysis with 10 mM pH 7.4 phosphate-
132 buffered saline [21]. The HDLs macromolecular composition was determined by measuring the protein
133 concentration by the Lowry method and lipid content (triglycerides, total cholesterol, esterified
134 cholesterol, and phospholipids) was determined using colorimetric reagents from Wako Diagnostics
135 (FujiFilm Wako Diagnostics, CA, U.S.A). The proportion of each component was estimated as a
136 percentage of the total HDLs mass. The size and subpopulations of the HDLs were determined by
137 gradient 4%-30% polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions, followed by
138 densitometric analysis of the gel to estimate the average particle size of HDLs and subclasses HDL2b,
139 HDL2a, HDL3a, HDL3b, and HDL3c [22]. The subclasses were expressed as a relative proportion of
140 100%. In each assay, a control sample was processed to compute the inter-assay coefficient of variation,
141 for this determination it was 5.1 %

142

143 Fructosamine content in HDLs was determined using a colorimetric reagent in an automated analyzer
144 (Cobas Integra Fructosamine, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The intermediate products,

6

145 dicarbonyl groups, were determined as previously reported [23], with isolated HDLs incubated with 2,4-
146 dinitro-phenylhydrazine in 2.5 N HCl for 15–60 min at 25 ° C, precipitated with 20% trichloro-acetic-
147 acid (w/voL), centrifuged, and washed with 10% trichloro-acetic-acid (w/voL). The precipitate was
148 dissolved with HCl 6M guanidine added to the plate and incubated for 10 minutes at 37 °C before
149 measuring absorbance at 370 nm with a Biotek Synergy H1 microplate spectrophotometer (Biotek
150 Instruments, Winooski VT, U.S.A.). AGEs were quantified using the OxiSelect commercial competitive
151 ELISA kit (STA-817, Cell Biolabs, CA, U.S.A.) which identifies the carboxymethyl lysine and
152 pentosidine species.

153 MOMCs isolation.

154 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy blood bank volunteers were isolated by
155 histopaque-1077 gradient centrifugation (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A) from 50 mL of peripheral blood
156 obtained by venipuncture. PBMCs were seeded on a fibronectin-coated plate with RPMI medium
157 supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB, Sigma-Aldrich, MO, USA.), 2mM L-glutamine, 50
158 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin, at a density of 20×10^6 cells and cultured at 37°C in a 5%
159 CO₂ atmosphere for 24 h. Non-adherent cells were discarded, and adherent cells (fresh monocytes) were
160 used as control cells or to induced MOMCs as previously reported [24]. Briefly, fresh monocytes were
161 cultured with endothelial cell growth basal medium-2 (EBM2) supplemented with 5% fetal bovine
162 serum, vascular endothelial grown factor (VEGF), basic fibroblast growth factor, epidermal growth
163 factor, insulin-like growth factor-1, and ascorbic acid (Lonza Pharma, Basel, Switzerland) at 37°C in a
164 5% CO₂ atmosphere until confluence. Fresh culture medium was added every three days.

165

166 MOMCs endothelial marker expression.

167 Adherent mononuclear cells, cultured for 24 h as previously described [24], were incubated with 50
168 µg/mL of HDLs isolated from individuals in the three groups, using non-supplemented RPMI-1640 for

7

169 45 min in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C, followed by extensive washing. The cells were washed with
170 10 mM PBS before being seeded in EBM2 culture medium. After 4 days, the cells were detached with 1
171 mL of trypsin EDTA (0.25%), washed with PBS, and incubated for 20 min at room temperature in the
172 dark with the previously determined optimal dilution of the primary antibody diluted in Tris-buffered
173 saline. Mouse monoclonal anti-CD14-Peridinin-Chlorophyll-protein (PerCP) (cat. 301848, 1:20), anti-
174 CD34-allophycocyanin (APC) (cat. 343608, 1:40), and anti-VEGFR2/KDR-PE (cat. 359904, 1:60) were
175 from BioLegend (San Diego, CA, USA). At the end of the incubation period, cells were fixed with 2%
176 paraformaldehyde for 20 min, washed with PBS/3% albumin, and analyzed on a BD FACSCalibur flow
177 cytometer (BD Biosciences, CA, USA). We collected 5,000 events per experiment for analysis using
178 FlowJo software V10 (BD Biosciences, CA, USA)

179 **Statistical analysis.**

180 The results are presented as a mean standard deviation, median (interquartile range), or percentage of
181 subjects. To compare means between two conditions, the student's t test was used. Comparisons between
182 the three study groups were performed using a one-way ANOVA followed by Bonferroni correction.
183 Median differences were analyzed using the Kruskal-Wallis test, and the chi-squared test was used to
184 determine proportion differences. A Pearson correlation assessed the relationship between HDLs
185 glycation products and KDR expression in MOMCs cells. A p-value < 0.05 was considered significant,
186 and STATA/IC 12.0 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA). was used for statistical analysis.

187

188 **Results.**

189 Anthropometric and clinical characteristics showed that selected groups were similar regarding age, sex
190 prevalence, glomerular filtration rate, smoking prevalence, and plasma concentration of total
191 cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein B-100, AST, ALT, and
192 hs-CRP. However, the body mass index was slightly higher in the prediabetes group compared to the

8

193 normoglycemic group, but similar to the T2D group (Table 1). As expected, hemoglobin A1C values
194 were significantly higher in the prediabetes and T2D groups compared to the normoglycemic group (p
195 trend <0.001). Furthermore, the HDLs cholesterol concentration was significantly lower in the T2D
196 group than in the pre-diabetic and normoglycemic groups (p < 0.05).

197

198 The analysis of the HDLs-glycation showed that HDLs from T2D individuals had a significantly higher
199 concentration of fructosamine (5.2 mMol/mg protein) than those of normoglycemic individuals (4.6
200 mMol/mg, p < 0.04). That difference was not statistically significant between T2D and the prediabetes
201 group (p=0.088), probably due to the higher dispersion in the later. Similar results were observed in the
202 advanced HDLs glycation products in the T2D individuals (14.3 [8.7-21.6, interquartile range-IQR] mg
203 BSA-AGEs/mg) compared to normoglycemic subjects (7.7 [6.6-10.2, IQR] mg BSA-AGEs/mg, p
204 =0.012), but marginally different compared to prediabetes subjects (8.7 [6.7-12.7 IQR] mg BSA-
205 AGEs/mg, p =0.088), The concentration of the three HDLs glycation products in the prediabetes group
206 was not significantly different from those of the normoglycemic group (Figure 1).

207

208 The HDLs size analyses indicates that HDLs were significantly smaller in the T2D subjects than in the
209 prediabetes and normoglycemia groups (8.32 nm vs 8.44 nm and 8.51 nm, respectively, p trend < 0.039).
210 There was a significant decrease in the proportion of HDL2b and HDL2a and an increase of HDL3c in
211 the HDLs of the T2D individuals (p < 0.01) compared to normoglycemic and pre-diabetic individuals
212 (Table 2). Interestingly, the macromolecular composition of HDLs in relation to the percentage of free
213 and esterified cholesterol, triglyceride, phospholipid, and protein content was very similar among the
214 three groups (Table 2).

215

216 To asses the impact of the HDLs on the differentiation of MOMCs. First, the differentiation of fresh

9

217 monocytes to MOMCs was induced using the endothelial differentiation medium EBM2 for 14 days, a
218 transient increase in KDR expression was observed with a peak at day 4 (Fig 2A). MOMCs incubated
219 with EBM2 increased their size (FSC) and granularity (SCC) (Fig 2C) compared to fresh monocytes
220 (Fig2B). Furthermore, among CD14+ cells incubated with EBM2, there were higher percentages of
221 KDR+, CD34+, and CD14+/CD34+/KDR+ compared to fresh monocytes maintained in RPMI (Figure
222 2A-B). Specifically, the percentage of KDR+, CD14+CD34+KDR+ cells increased from 24.3%, 3.6%,
223 and 61.5% in fresh monocytes to 50.2%, 8.1%, and 81.6 % in MOMCs cells ($p=0.03$) (Figure 2D).
224 Although cell culture viability after 4 days was nearly 98%, the reduction in KDR expression or KDR+
225 cell count was not attributed to enhanced cellular toxicity, as cellular viability at day 4 was similar to the
226 percentage of dead cells between groups.

227

228 Importantly, when MOMCs cells were cultured in the presence of HDLs from each group, we found no
229 differences in the percentage of cells expressing CD14+ among groups. Compared with HDLs from the
230 normoglycemic group, those from newly diagnosed T2D subjects induced a significantly lower
231 expression of CD14+KDR+ (60.4% versus 46.0%; $p < 0.002$), CD14+CD34+ (12.7% versus 6.1%; $p =$
232 0.020) and CD14+CD34+KDR+ (8.9 versus 4.9; $p = 0.010$). HDLs isolated from prediabetes subjects
233 had an intermediate effect on MOMCs cells and reached statistical differences with the observed in newly
234 diagnosed T2D, but not with normoglycemic subjects (Figure 3).

235 HDLs size and composition were not found to be associated with KDR expression in MOMCs (free
236 cholesterol: $r=-0.0583$, $p=0.685$; esterified cholesterol: $r=-0.1911$, $p=0.071$; phospholipids: $r=-0.1911$,
237 $p=0.179$; and protein: $r=0.112$, $p=0.433$), except for HDLs-triglycerides which showed a positive
238 correlation with KDR ($r=0.295$, $p=0.034$). Moreover, neither fructosamine nor carbonyls in HDLs from
239 each group correlated with KDR expression. Nevertheless, the AGEs products in HDLs showed an
240 inverse and significant correlation with KDR expression in pooled (Figure 4A), normoglycemic (Figure

10

241 4B), and newly T2D patients (Figure 4D). Conversely, there was no correlation of KDR expression with
242 AGEs in HDLs, among individuals with prediabetes (Figure 4C).

243

244 **Discussion**

245 Patients with T2D develop a high prevalence of vascular complications due to endothelial dysfunction
246 [1, 8]. Although HDLs play a pivotal role in maintaining endothelial integrity, by promoting angiogenesis
247 [15] and inducing endothelial-like differentiation of EPCs [24], the HDLs alteration could compromise
248 their vasoprotective properties. The results of the present study showed progressive higher glycation and
249 smaller HDLs size in individuals with normoglycemia, prediabetes, and newly diagnosed T2D.
250 Moreover, we observed that HDLs from individuals with prediabetes and newly diagnosed T2D promote
251 a gradual lower expression of CD14/KDR expression in MOMCs cultures, reaching statistical differences
252 only in those subjects with newly diagnosed T2D. Notably, the concentration of AGEs in HDLs from
253 these T2D patients inversely correlates with CD14/KDR expression, which suggests that advanced
254 glycation end products could have deleterious effects on vascular integrity even during the early stages
255 of diabetes.

256

257 Endothelial dysfunction in T2D is linked to major vascular complications [1, 8], however, the underlying
258 mechanisms of the link are complex. Several subpopulations of progenitor cell participate in endothelial
259 repair, including MOMCs that contribute to vascular restoration through its differentiation into
260 endothelial cells-like phenotype. Originating from myeloid lineage, MOMCs exhibit a remarkable
261 plasticity, allowing them to express endothelial markers such as KDR or Tie-2, while retaining the
262 expression of CD14 and CD34 [9-12]. Thus, MOMCs represent a crucial subpopulation of endothelial
263 progenitors that can be regarded as a rapid response system against vascular insults. MOMCs are easily
264 incorporate into injury sites, where increase the number of CD14+/CD16+ monocytes, stimulating the

11

265 proliferation of medial-layer cells, smooth muscle, and fibroblasts, which are essential in the wound
266 healing process [43]. The present study shows that HDLs glycation may reduce the expression of KDR
267 in MOMCs, mainly in subjects with newly diagnosis of T2D. Moreover, the correlation analysis indicates
268 that glycated-HDLs could inhibit MOMCs differentiation due to its AGEs content. These findings are
269 supported by studies showing that AGEs interfere with scavenger receptor class B type I (SRBI) binding
270 and signaling [37, 38], which impact on SRBI-related angiogenesis [39] and KDR expression [16].
271 Furthermore, it has been also reported that the reduced differentiation rate of MOMCs could be a result
272 of the downregulation of receptors like ABCA1, ABCG1, and SRBI that are mediated by a signaling
273 pathway associated with the AGES receptor [41, 42].

274 The results of the present study showed that HDLs isolated from subjects with normoglycemia or
275 prediabetes have similar concentration of glycation products. Nevertheless, HDLs from newly diagnosed
276 T2D individuals contained a significantly higher concentration of fructosamine and AGEs, reflecting
277 early glycation of HDLs and maybe other proteins in these kinds of patients who have just debuted with
278 the disease. Although a previous study reported high glycation levels in lipoproteins from pre-diabetic
279 compared with normoglycemic individuals, it is important to note that there are differences in the
280 sampling methods from that and the present analysis, as well as the consistently higher levels of
281 lipoproteins-glycation, even among normoglycemic individuals from that study [30]. Additionally, the
282 present analysis was performed in carefully selected and well-defined normoglycemic, prediabetes, and
283 T2D patients, in whom pharmacological treatment was avoided to minimize it as a confounding factor.
284 On the other hand, while the association of endothelial dysfunction and lipid species like LDL and VLDL
285 has been previously reported in subjects with prediabetes [30, 31], the role of HDLs-glycation and AGEs
286 on endothelial precursors has not been fully explored.

287 Beyond HDLs oxidation, which affects endothelial precursor cell functions in a dose-dependent manner
288 [32], abnormalities in HDLs-composition affect other biological functions. These include increase

289 susceptibility to oxidation due to phospholipid enrichment [33], depletion of sphingosine 1 phosphate
290 (S1P) that impairs endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity [34], and elevated triglycerides that
291 compromise cholesterol efflux capacity of HDLs [35]. Moreover, it is well known that small HDLs size
292 correlates with increased cardiovascular risk [36] and individuals with insulin resistance and T2D are
293 characterized by having a small HDLs size [50]. Although the present analysis indicated minimal
294 alteration in most of the HDLs-components, we found small HDLs size (Table 2) and a significant
295 correlation of the triglycerides HDLs content with KDR expression ($r=0.295$, $p=0.034$) among patients
296 with newly diagnosed T2D. We did not find a direct correlation between HDLs size and glycation in
297 HDLs, nevertheless, glycation has been reported to accelerate apolipoprotein A1 catabolism, which
298 suggests that HDLs glycation could potentially leads to reduced HDLs size in these patients who have
299 just identified to T2D [6].

300

301 Strengths and limitations.

302 One of the main strengths of this study is the comprehensive characterization of the individuals, which
303 minimizes potential biases derived from comorbidities and associated treatments that are common in
304 T2D patients with long term evolution. This analysis allows us to use HDLs characteristics as indicators
305 of metabolic alterations, shedding light on their impact on vascular impairment in T2D. However, it is
306 important to acknowledge the study limitations, which include the relatively small sample size and the
307 cross-sectional design. The later does not allows to establish causality in this study. Therefore, the
308 findings should be validated through a larger-scale study. Additionally, it should be noted that the
309 assessment of HDLs and their structural characteristics involves time-consuming techniques. Finally, it
310 should be mentioned that this study did not assess other AGEs such as methylglyoxal or glycol-aldehyde,
311 rather our focus was on the determination of carboxymethyl-lysine and pentosidine. These products are
312 known to be present in HDLs proteins, with apolipoprotein A1 constituting approximately 80% of the

13

313 protein component. These findings underscore the need to develop and standardize glycation
314 measurement techniques that can offer insights beyond conventional glycemic control measures.

315

316 **Conclusions.**

317 In this clinical study, we found that HDLs from newly diagnosed T2D subjects have higher glycation that
318 could negatively impact the expression of KDR in MOMCs cells, inhibiting their endothelial
319 differentiation capacity. Our results highlight the importance of glycemia not only in diabetes patients
320 but also in prediabetes individuals who start to have vascular damages due to impaired HDLs
321 composition and function. The results highlighted that these alterations could be present even during the
322 early stages of the disease.

323

324 **Abbreviations:** AGEs: advanced glycation end products; APC: allophycocyanin; EBM2: endothelial
325 cell growth basal medium-2; EPC: endothelial progenitor cells; HDLs: High-density lipoproteins;
326 MOMCs: Monocyte-derived multipotential cells; PE: phycoerythrin; PerCP: Peridinin-chlorophyll-
327 protein; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; T2D: Type 2 diabetes; VEGFR2/KDR: vascular
328 endothelial growth factor receptor 2/kinase domain receptor; SRB-I: scavenger receptor class B type I.

329 **Ethical approval and consent to participate:** The protocol was approved by the Ethics and Research
330 Committees of the National Institute of Cardiology, based on the Declaration of Helsinki. All subjects
331 gave their informed consent to participate in this study.

332 **Availability and data materials:** The data supporting the findings of this study are accessible upon
333 reasonable request from the corresponding author.

334 **Competing interest:** The authors declare that they have no competing interests

335 **Funding:** This study received partial support from the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
336 (Project No 16-977).

14

337 **Authors' contributions:** E.J.G., L.F.M.E., and F.M.R conceptualization, manuscript writing, and
338 critical review and revision A.P.A, A.M.U., M.T.T., R.N.V., E.R.M and A.M.M.D. researched data,
339 interpreted the results, and provided critical review. F.M.R., J.G.J.R, and J.P.R.G provided critical review
340 and contributed to the discussion. E.J.G and L.F.M.E. are the guarantors of this work and, as such, had
341 full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy
342 of the data analysis.

343 **Acknowledgments:** The authors would like to express their gratitude to the study participants and extend
344 special thanks to Maria del Carmen Gonzalez Salazar for her invaluable contribution to patient
345 recruitment. Esteban Jorge Galarza is a student in the Biological Sciences Doctoral Program, School of
346 Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico

347

348 **References**

- 349 1. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links.
350 The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010;53:1270–87.
- 351 2. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical
352 Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41:S13–27.
- 353 3. Rye K-A, Barter PJ. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res*. 2014;114:143–56.
- 354 4. Bonizzi A, Piuri G, Corsi F, Cazzola R, Mazzucchelli S. HDL Dysfunctionality: Clinical Relevance
355 of Quality Rather Than Quantity. *Biomedicines*. 2021;9:729.
- 356 5. Kontush A, Chapman MJ. Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Curr Diab Rep*.
357 2008;8:51–9.
- 358 6. Kashyap SR, Osme A, Ilchenko S, Golizeh M, Lee K, Wang S, et al. Glycation Reduces the Stability
359 of ApoAI and Increases HDL Dysfunction in Diet-Controlled Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*.
360 2018;103:388–96.

15

- 361 7. Ravi R, Ragavachetty Nagaraj N, Subramaniam Rajesh B. Effect of advanced glycation end product
362 on paraoxonase 2 expression: Its impact on endoplasmic reticulum stress and inflammation in HUVECs.
363 Life Sciences. 2020;246:117397.
- 364 8. Su Y, Liu X-M, Sun Y-M, Jin H-B, Fu R, Wang Y-Y, et al. The relationship between endothelial
365 dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. Int J Clin Pract. 2008;62:877–82.
- 366 9. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived
367 from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. Circulation. 2003;107:1164–9.
- 368 10. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, et al. Human circulating CD14+
369 monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. J Leukoc Biol.
370 2003;74:833–45.
- 371 11. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, et al. Characterization of two types
372 of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. Arterioscler
373 Thromb Vasc Biol. 2004;24:288–93.
- 374 12. Chopra H, Hung MK, Kwong DL, Zhang CF, Pow EHN. Insights into Endothelial Progenitor Cells:
375 Origin, Classification, Potentials, and Prospects. Stem Cells Int. 2018;2018:9847015.
- 376 13. Lucchesi D, Popa SG, Sancho V, Giusti L, Garofolo M, Daniele G, et al. Influence of high density
377 lipoprotein cholesterol levels on circulating monocytic angiogenic cells functions in individuals with
378 type 2 diabetes mellitus. Cardiovasc Diabetol. 2018;17:78.
- 379 14. Jin F, Hagemann N, Sun L, Wu J, Doeppner TR, Dai Y, et al. High-density lipoprotein (HDL)
380 promotes angiogenesis via S1P3-dependent VEGFR2 activation. Angiogenesis. 2018;21:381–94.
- 381 15. Primer KR, Psaltis PJ, Tan JTM, Bursill CA. The Role of High-Density Lipoproteins in Endothelial
382 Cell Metabolism and Diabetes-Impaired Angiogenesis. Int J Mol Sci. 2020;21:E3633.

- 383 16. Li H-M, Mo Z-W, Peng Y-M, Li Y, Dai W-P, Yuan H-Y, et al. Angiogenic and Antiangiogenic
384 mechanisms of high density lipoprotein from healthy subjects and coronary artery diseases patients.
385 *Redox Biol.* 2020;36:101642.
- 386 17. Li Y, Zhao M, He D, Zhao X, Zhang W, Wei L, et al. HDL in diabetic nephropathy has less effect in
387 endothelial repairing than diabetes without complications. *Lipids Health Dis.* 2016;15:76.
- 388 18. Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, Bahlmann FH, et al. Endothelial-
389 vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus
390 but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation.* 2010;121:110–22.
- 391 19. Jorge-Galarza E, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Cardoso-Saldaña G,
392 Vargas-Alarcón G, et al. Adipose tissue dysfunction increases fatty liver association with pre diabetes
393 and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2016;8:73.
- 394
- 395 20. DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the
396 estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics
397 Prevalence Study. *JAMA.* 1986;256:2372–7.
- 398 21. Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Martínez-Alvarado R, Jorge-Galarza E, Posadas-Sánchez R,
399 Cardoso-Saldaña G, et al. High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican
400 adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with
401 insulin and C-reactive protein. *Atherosclerosis.* 2008;201:392–7.
- 402 22. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins
403 by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1981;665:408–19.
- 404 23. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized
405 proteins. *J Biol Chem.* 1987;262:5488–91.

- 406 24. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami Y, Ikeda Y. Endothelial Differentiation
407 Potential of Human Monocyte-Derived Multipotential Cells. *STEM CELLS*. 2006;24:2733–43.
- 408 25. Valente AJ, Irimpen AM, Siebenlist U, Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction
409 and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med*.
410 2014;70:117–28.
- 411 26. Tan JTM, Prosser HCG, Dunn LL, Vanags LZ, Ridiandries A, Tsatralis T, et al. High-Density
412 Lipoproteins Rescue Diabetes-Impaired Angiogenesis via Scavenger Receptor Class B Type I. *Diabetes*.
413 2016;65:3091–103.
- 414 27. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017;389:2239–51.
- 415 28. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, et al. Glycation impairs high-density
416 lipoprotein function. *Diabetologia*. 2000;43:312–20.
- 417 29. Cochran BJ, Ong K-L, Manandhar B, Rye K-A. High Density Lipoproteins and Diabetes. *Cells*.
418 2021;10:850.
- 419 30. Al Saudi RM, Kasabri V, Naffa R, Bulatova N, Bustanji Y. Glycated LDL-C and glycated HDL-C
420 in association with adiposity, blood and atherogenicity indices in metabolic syndrome patients with and
421 without prediabetes. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2018;9:311–23.
- 422 31. Su Y, Liu X-M, Sun Y-M, Jin H-B, Fu R, Wang Y-Y, et al. The relationship between endothelial
423 dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. *Int J Clin Pract*. 2008;62:877–82.
- 424 32. Wu J, He Z, Gao X, Wu F, Ding R, Ren Y, et al. Oxidized high-density lipoprotein impairs endothelial
425 progenitor cells' function by activation of CD36-MAPK-TSP-1 pathways. *Antioxid Redox Signal*.
426 2015;22:308–24.
- 427 33. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The
428 oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*.
429 2004;45:993–1007.

430 34. Denimal D, Monier S, Brindisi M-C, Petit J-M, Bouillet B, Nguyen A, et al. Impairment of the Ability
431 of HDL From Patients With Metabolic Syndrome but Without Diabetes Mellitus to Activate eNOS:
432 Correction by SIP Enrichment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:804–11.

433 35. Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol
434 transport. *J Lipid Res.* 2002;43:1264–74.

435 36. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després J-P, Hovingh GK, Stroes ESG, et al. High-density
436 lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med.* 2009;150:84–93.

437 37. Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end
438 products. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:258–62.

439 38. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, et al. Scavenger receptor class B
440 type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol*
441 *Chem.* 2001;276:13348–55.

442 39. Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell
443 functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2014;103:350–61.

444 40. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-binding cassette
445 transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science.* 2010;328:1689–93.

446 41. Daffu G, Shen X, Senatus L, Thiagarajan D, Abedini A, Hurtado Del Pozo C, et al. RAGE Suppresses
447 ABCG1-Mediated Macrophage Cholesterol Efflux in Diabetes. *Diabetes.* 2015;64:4046–60.

448 42. Nagata H, Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, et al. AGEs inhibit scavenger receptor
449 class B type I gene expression via Smad1 in HUVECs. *J Mol Endocrinol.* 2021;

450 43. Smith RJ, Yi T, Nasiri B, Breuer CK, Andreadis ST. Implantation of VEGF-functionalized cell-free
451 vascular grafts: regenerative and immunological response. *FASEB J.* 2019;33:5089–100.

452 44. Nasiri B, Yi T, Wu Y, Smith RJ, Podder AK, Breuer CK, et al. Monocyte Recruitment for Vascular
453 Tissue Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2022;11:e2200890.

454 45. Smith RJ, Nasiri B, Kann J, Yergeau D, Bard JE, Swartz DD, et al. Endothelialization of arterial
455 vascular grafts by circulating monocytes. *Nat Commun.* 2020;11:1622.

456 46. Yiu K-H, Tse H-F. Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial
457 progenitor cell characteristics and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1136–43.

458 47. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, Baesso I, Penno G, Balbarini A, et al. Glucose tolerance is
459 negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia.* 2007;50:2156–63.

460

461 48. Bonora E. Postprandial peaks as a risk factor for cardiovascular disease: epidemiological
462 perspectives. *Int J Clin Pract Suppl.* 2002;5–11.

463 49. Bonora E, Tuomilehto J. The pros and cons of diagnosing diabetes with A1C. *Diabetes Care.* 2011;34
464 Suppl 2:S184-190.

465 [50] Jorge-Galarza E, Medina-Urrutia A, Reyes-Barrera J, Torres-Tamayo M, Montaña-Estrada LF,
466 Páez-Arenas A, et al. Adipose tissue dysfunction serum markers are associated with high density
467 lipoprotein size and glycation in the early stages of type 2 diabetes. *Lipids in Health and Disease.* 1 de
468 julio de 2023;22(1):89.

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481 **Table 1.** Clinical and metabolic characteristics of the studied groups

	Normoglycemic n=20	Prediabetes n=20	Type 2 Diabetes n=20	p trend
Age (years)	49 ± 6.5	52 ± 5.9	51 ± 5.3	0.187
Gender (male/female)	7/13	7/13	10/10	0.535
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 3.3	28.1 ± 4.1 *	27.9 ± 3.9	0.039
Smoking (%)	3 (15)	6 (30)	2 (10)	0.320
Hemoglobin A1C (%)	5.51 (5.3-5.6)	5.85 (5.8-6.1) *	6.58 (6.5-7.4) *†	<0.001
Fasting glucose (mg/dL)	89.1 (83-95)	100 (96-105) *	126 (112-148) *†	<0.001
Total cholesterol (mg/dL)	194 (167-220)	203 (178-217)	171 (157-208)	0.260
LDL cholesterol (mg/dL)	122 (95-142)	127 (115-149)	108 (91-137)	0.250
HDL cholesterol (mg/mL)	51.5 (39-60)	44.4 (41-59)	38.2 (31-48) *†	0.019
Triglycerides (mg/mL)	108 (82-150)	115 (102-171)	148 (123-181)	0.158
ApoA1 (mg/dL)	151 ± 29	141 ± 19	139 ± 27	0.376
ApoB-100 (mg/dL)	109 ± 27	115 ± 29	115 ± 26	0.608
AST (IU/L)	20 (18-24)	18.4 (16-23)	22 (17-25)	0.457
ALT (IU/L)	22 (14-37)	19 (14-29)	25 (19-36)	0.235
eGFR (ml*min/1.73m ²)	93.6 (85-104)	97 (87-103)	103 (84-109)	0.614
hsCRP (mg/L)	1.42 (0.8-2.2)	1.08 (0.61-2.8)	1.9 (0.9-5.1)	0.320

482 Values are expressed as mean ± standard deviation, median (interquartile range) or number of subjects

483 (%). HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; AST:

484 aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase. eGFR: estimated glomerular filtration rate;

485 hsCRP: high sensitive C reactive protein. * P<0.05 vs normoglycemic, † p<0.05 vs Prediabetes.

486

487

488

21

489

490

491

492 **Table 2.** Subgroups and composition of HDLs particles

	Normoglycemic n=20	Prediabetes n=20	Type 2 diabetes n=20	p trend
HDL2b (%)	8.8 ± 3.9	7.83 ± 2.2	6.28 ± 2.6 *†	0.018
HDL2a (%)	17.5 ± 3.7	15.4 ± 3.8	13.4 ± 4.9 *†	0.001
HDL3a (%)	23.2 ± 2.7	23.4 ± 2.6	21.5 ± 4.2	0.105
HDL3b (%)	25.4 ± 2.7	26.4 ± 2.6	25.9 ± 2.6	0.430
HDL3c (%)	24 ± 6.6	27.0 ± 5.7	32.6 ± 10 *†	0.010
HDLs Mean diameter (nm)	8.51 ± 0.2	8.44 ± 0.2	8.32 ± 0.22 *†	0.002
Free cholesterol (%)	1.96 (1.72-2.22)	1.74 (1.22-2.32)	1.79 (1.23-2.21)	0.598
Esterified cholesterol (%)	20.1 (18-22)	20.7 (19-21)	20.6 (19-21)	0.964
Phospholipids (%)	3.8 (3.1-4.4)	3.4 (2.9-4.5)	4.1 (2.9-5.9)	0.502
Triglycerides (%)	21.7 (20-22)	21.6 (20-22)	21.5 (20-22)	0.866
Protein (%)	51.8 (50-53)	52.7 (50-54)	51.3 (48-55)	0.778

493 Values are expressed as mean ± standard deviation, median (interquartile range).

494 * P<0.05 vs normoglycemic, † p<0.05 vs Prediabetes.

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506 Figure 1. Glycation products in HDLs. Early (fructosamine), intermediate (carbonyls), and advanced
507 glycation products (AGEs) in HDLs, were isolated from the normoglycemic (NG), prediabetes, and type
508 2 diabetes (T2D) subjects. N=20, p values were determined by the Kruskal-Wallis test.

509

510 Figure 2. Comparative expression of CD14, KDR, and CD34 in fresh monocytes and MOMCs. Transient
511 expression of KDR in fresh monocytes that were cultivated with endothelial basal medium EBM2 for up
512 to 14 days (A). Comparison of size (FSC), granularity (SCC), and expression of CD14, CD34 and KDR
513 on fresh monocytes (B) and MOMCs (B) cultivated for 4 days, representative of 5 experiments. Mean
514 expression of KDR, CD34, and CD14/CD34/KDR in MOMCs and Fresh monocytes, n= 5 assays. *
515 $p < 0.05$ vs fresh monocytes obtained by Student t-test (D). Red color: cells without staining, blue color:
516 cells with staining for the indicated fluorochromes.

517

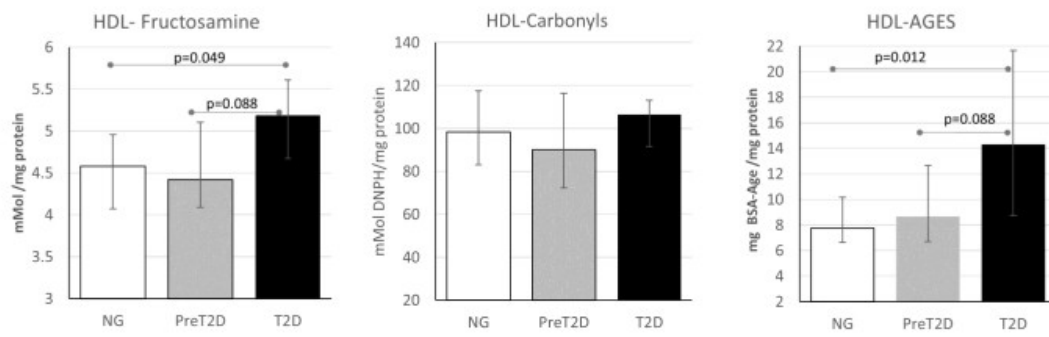
518 Figure 3. Inhibition of the expression of endothelial markers in MOMCs. MOMCs were isolated as
519 described in the materials and methods and incubated with 50 μ g of HDLs from individuals of the studied
520 groups during 45 minutes at 24 and 48 hours. Then, the cells were cultured with endothelial basal medium
521 supplemented with vascular growth factors for 4 days and evaluated by flow cytometry. NG:
522 normoglycemic (n=17); prediabetes (n=18); and T2D: type 2 diabetes (n=17). p values were determined
523 by the Kruskal-Wallis test.

524

525 Figure 4. AGEs concentration in HDLs correlates with the percentage of CD14+KDR+ cells in individuals
526 from three studied groups, n = 52 (A), normoglycemic group, n = 17 (B), prediabetes group, n = 18 (C),
527 and diabetes patients, n = 17 (D). r = Pearson correlation coefficient values.

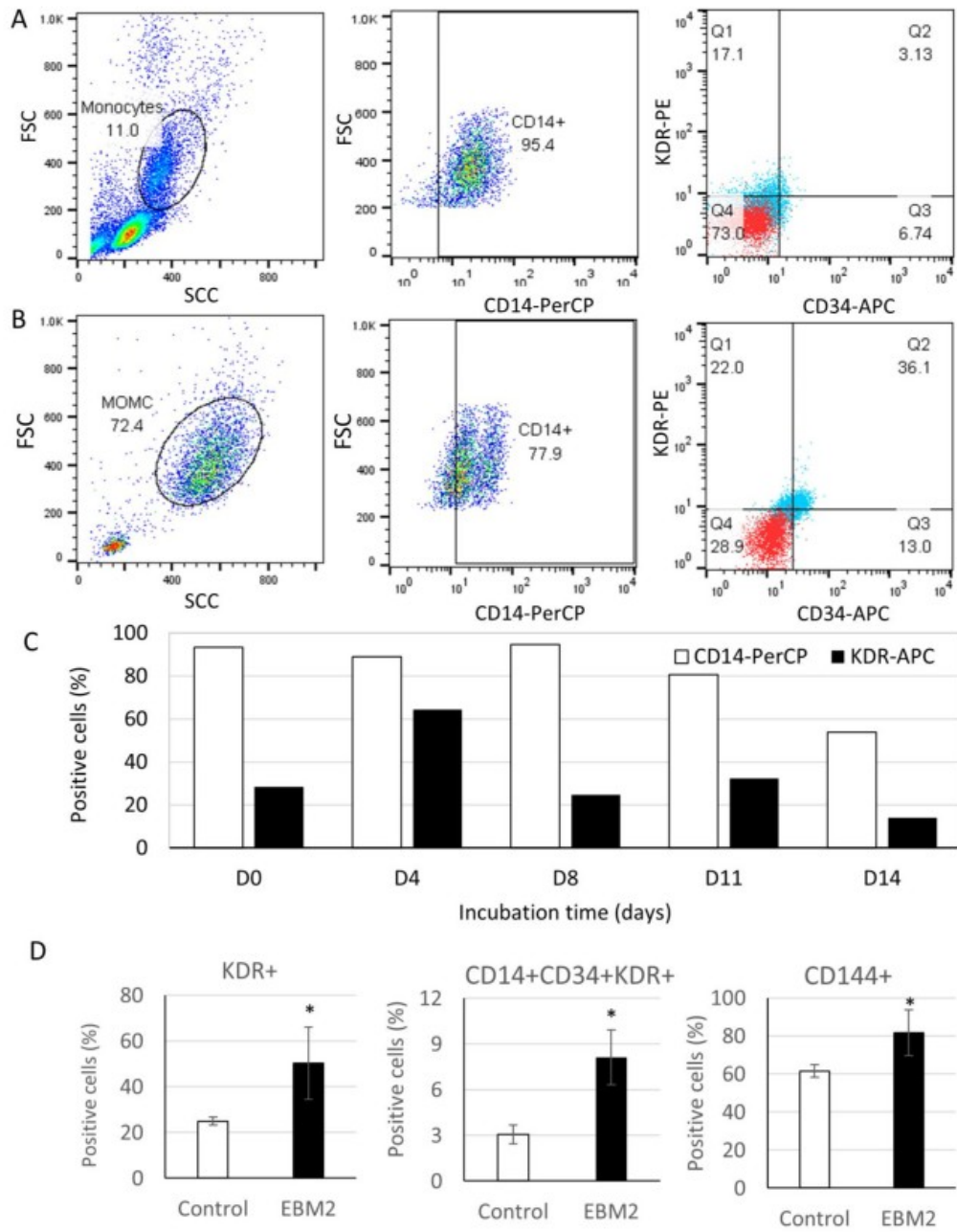
23

528



529

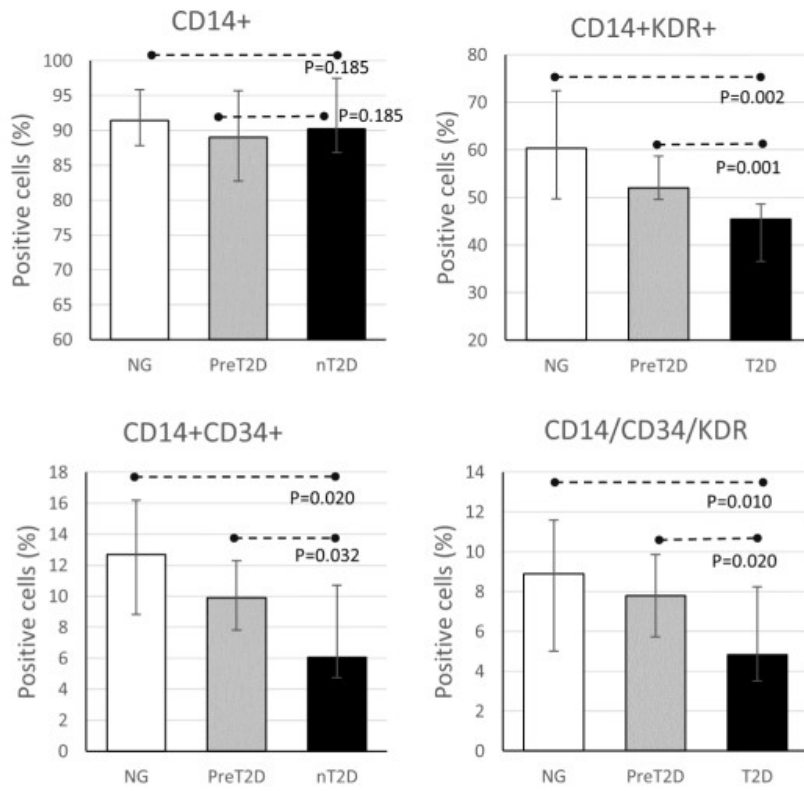
530 Figure 1.



531

532 Figure 2.

25



533

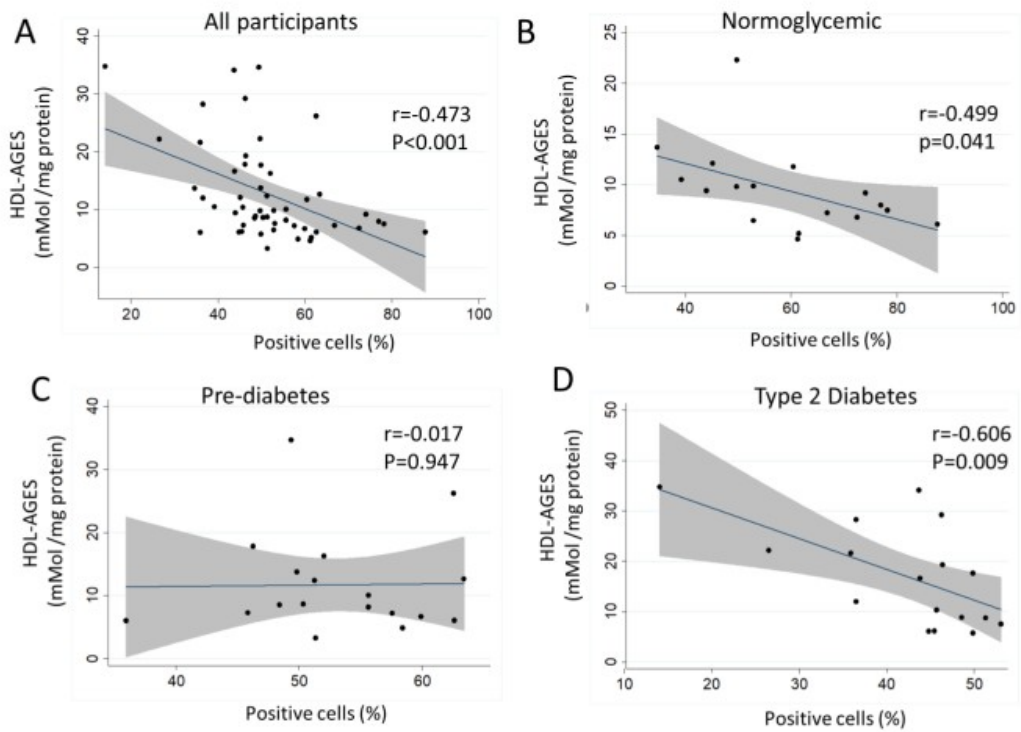
534 Figure 3

535

536

537

538



539

540 Figure 4.