

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estudio del receptor AdipoR1 en micropartículas endoteliales circulantes en plasma y su asociación con el marcador plasmático de daño endotelial sVCAM-1 de pacientes con diabetes mellitus tipo 2



Presenta

Martín Eduardo Almada Balderrama

Hermosillo, Sonora

Enero de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



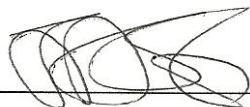
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



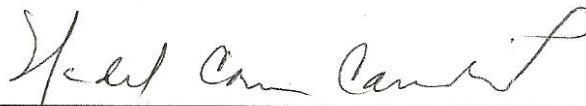
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

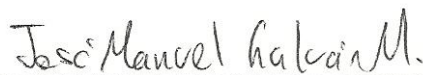
Los miembros del jurado Calificador designado para revisar el Trabajo de Tesis de **Martín Eduardo Almada Balderrama**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



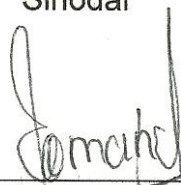
Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán
Director Académico



Dra. Maria del Carmen Candia Plata
Secretario



Dr. José Manuel Galván Moroyoqui
Sinodal



M. C. Román Escobar López
Sinodal

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, bajo la dirección de la Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán, en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora. Este trabajo se realizó con recursos aportados por el Programa de Mejoramiento del Profesorado de la Convocatoria 2013 de Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC con folio UNISON-PTC-184.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi guía, por todo lo que he recibido y todo lo que aún está por llegar.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora por brindarme las instalaciones para llevar a cabo parte de este trabajo.

Debo agradecer de manera muy especial y sincera a la Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán por el apoyo y la confianza que me ha brindado durante estos años, gracias por sus enseñanzas y su infinita paciencia.

De la manera más atenta también quiero agradecer a la Dra. Maria del Carmen Candia Plata por su tiempo y sus excelentes recomendaciones, las cuales han sido un valioso aporte para el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales Dr. José Manuel Galván Moroyoqui y M. en C. Román Escobar López, gracias también por su apoyo, su tiempo y sus importantes recomendaciones.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Dr. Luis Fernando López Soto, a la Dra. Alma Yolanda Camacho Villa, la M. en C. Karla Alejandra Monge Villegas, M. en C. Miriam Denisse García Villa y M en C. Ana Lourdes Mata Pineda, por los consejos y también su valiosa colaboración.

Al personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora en especial a la Q.B. Lourdes Cecilia Soto Gastelum y Q.B. Sandra Elena Amarillas Valenzuela, gracias por su tiempo.

Finalmente y lo más importante quiero agradecer a mi familia, mis padres, mis hermanos, mis amigos y muy especialmente a mi Caro. Muchas gracias a todos.

DEDICATORIA

Con mucho amor, cariño y dedicación para

Carolina,

mis padres Martín y Flora,

y mis hermanos Jocelyn y Gerardo.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
OBJETIVOS.....	vi
Objetivo General.....	vi
Objetivos Específicos	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
Generalidades de la Diabetes Mellitus Tipo 2.....	4
Epidemiología.....	4
Etiología	7
Factores genéticos.....	7
Factores asociados al estilo de vida.....	8
Patogenia	10
Complicaciones Vasculares.....	11
Disfunción Endotelial en la DM2.....	12
AdipoR1	18
Estructura y Función.....	19
Vías de Señalización de AdipoR1	19
Músculo esquelético.....	22

CONTENIDO

	Página
Hígado.....	23
Tejido adiposo.....	24
Endotelio vascular.....	25
Micropartículas.....	26
Micropartículas de Origen Endotelial.....	28
Características estructurales.....	29
Mecanismos de formación.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Diseño de Estudio.....	34
Descripción.....	34
Selección de Sujetos con DM2.....	34
Selección de Sujetos Control.....	35
Aspectos Bioéticos.....	35
Reactivos.....	36
Obtención de Muestras Biológicas.....	36
Medidas Antropométricas y Análisis de Laboratorio.....	37
Preparación y Almacenamiento de Plasma Libre de Plaquetas.....	38
Determinación de Micropartículas y Marcaje de Antígenos de Superficie Para el Análisis por Citometría de Flujo.....	38
Análisis Estadístico.....	40

CONTENIDO

	Página
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Conformación de Grupos.....	42
Comparación de los Parámetros Clínicos y de Laboratorio Entre el Grupo de Sujetos con DM2 y Grupo Control	42
Evaluación de las Asociaciones del Análisis Bioquímico	48
Análisis de los Modelos de Regresión Lineal de sVCAM-1 y HOMA-IR	53
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Principales países/territorios con DM2 en 2014 y estimación para 2035	6
II. Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio	43
III. Correlaciones de Pearson del análisis bioquímico en grupo de sujetos con DM2 y grupo control.....	49
IV. Análisis de regresión lineal para explicar la variación en sVCAM-1	54
V. Análisis de regresión lineal para explicar la variación en HOMA-IR	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Complicaciones microvasculares y macrovasculares en la DM2	13
2. Principales vías de señalización intracelular de la insulina.....	16
3. Estructura de los receptores de adiponectina.....	20
4. Señalización de adiponectina con su receptor AdipoR1.....	21
5. Representación y caracterización estructural de las micropartículas	27
6. Generación y efectos parácrinos de las micropartículas endoteliales	32
7. Posibles vías que conducen a la liberación de micropartículas.....	33
8. Protocolo de análisis de MP por citometría de flujo.....	39
9. Diferencia de MP e intensidad de fluorescencia entre el grupo de sujetos con DM2 y grupo control.	46
10. Correlaciones de Pearson de sVCAM-1 por grupo.....	50

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los niveles relativos del receptor AdipoR1 en EMP circulantes en plasma de pacientes con DM2 e identificar su posible asociación con el marcador plasmático de daño endotelial sVCAM-1.

Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de expresión relativa del receptor AdipoR1 en EMP circulantes en plasma de dos grupos de estudio (pacientes con DM2 sin y sujetos control sin DM2) mediante citometría de flujo.
2. Analizar en los dos grupos de estudio los niveles plasmáticos de adiponectina y sVCAM-1 mediante ELISA.
3. Evaluar la asociación entre los niveles relativos de AdipoR1 en EMP y la concentración plasmática de adiponectina y sVCAM-1 en los dos grupos estudiados.

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina (RI). Los niveles bajos de adiponectina en plasma se han relacionado con RI y la presencia de disfunción endotelial en la DM2 como un fenómeno proaterogénico con sobreexpresión de moléculas de adhesión. Se ha reportado un incremento en plasma del número de micropartículas (MP) y MP de origen endotelial (EMP) en pacientes con DM2, el cual está relacionado con el estado y activación del endotelio vascular. No se tienen reportes sobre los niveles o la participación en el metabolismo de la DM2 del receptor de la adiponectina “AdipoR1” en humanos. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar en plasma de pacientes con DM2 los niveles relativos de AdipoR1 en EMP e identificar su asociación con la forma soluble de la molécula de adhesión VCAM-1 (sVCAM-1) como marcador de daño endotelial. Se utilizaron muestras sanguíneas de pacientes con DM2 y sujetos control para realizar un análisis que incluyó adiponectina y sVCAM-1 mediante ensayos ELISA, el cálculo de HOMA-IR (estimador de RI) y un análisis de MP y antígenos de superficie por citometría de flujo. Mientras que la adiponectina se observó disminuida, sVCAM-1 y HOMA-IR resultaron incrementados en el grupo de DM2. El porcentaje de MP anexina V, CD144 (EMP), CD106 y CD144/CD106 en el grupo de DM2 fue mayor y el de MP AdipoR1 menor. Se evidenció en ambos grupos una correlación positiva de sVCAM-1 con HOMA-IR y EMP, así como una correlación negativa de sVCAM-1 con adiponectina (grupo control) y MP AdipoR1. Los modelos de regresión lineal evidenciaron la dependencia de HOMA-IR con adiponectina y AdipoR1 en MP, así como la de sVCAM-1 con adiponectina y HOMA-IR (grupo control). Estos resultados permiten suponer como la variación de los niveles y por lo tanto de los efectos antiinflamatorios y citoprotectores del complejo adiponectina-AdipoR1 podría afectar la concentración en plasma de moléculas de adhesión y por lo tanto el óptimo funcionamiento del endotelio vascular como sucede por ejemplo, en la DM2.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) abarca un grupo de trastornos caracterizados por un alto nivel de glucosa en sangre como resultado de defectos en la capacidad del organismo para producir o utilizar la hormona insulina (American Diabetes Association, 2014). La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) conocida anteriormente como “diabetes no insulino dependiente” representa al menos el 90% del total de los casos de diabetes, se caracteriza por la presencia de diferentes niveles de resistencia a la insulina y constituye un padecimiento actual de creciente prevalencia que suma hoy en día más de 387 millones de casos en el mundo (International Diabetes Federation, 2013). Las enfermedades cardiovascular, renal y cerebrovascular son alteraciones graves en el organismo que se asocian con la DM2. Un factor común entre estas complicaciones es el deterioro de la función endotelial propiciado en parte por la hiperglicemia crónica característica de la DM2 (Petrofsky, 2011).

La adiponectina es una hormona proteica sintetizada y secretada principalmente por el tejido adiposo, esta adipocina es conocida por ejercer un importante papel como regulador del metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como de promover un efecto antiinflamatorio y citoprotector a nivel del endotelio vascular (Yamauchi y col., 2003; Xin y col., 2011). Existen dos receptores celulares descubiertos para la adiponectina denominados “AdipoR1” y “AdipoR2”, los cuales son proteínas integrales de membrana que presentan siete dominios transmembranales. AdipoR1 se encuentra de manera ubicua en el organismo, es decir en células de endotelio vascular, hígado, adipocitos, hipotálamo, riñón y hueso, pero se observa en mayor proporción en células de músculo esquelético, a diferencia de AdipoR2 el cual se expresa de manera predominante en células hepáticas (Kadowaki y Yamauchi, 2005).

Estudios realizados “in vitro” y en modelos murinos demuestran que la adiponectina al unirse a su receptor de superficie AdipoR1 induce la activación de rutas de señalización intracelulares que intervienen en la captación de glucosa mediante la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la superficie celular (Schmid y col., 2013), en la oxidación de los ácidos grasos mediante la regulación positiva y negativa de las enzimas acilcoenzima A oxidasa y acetilcoenzima A carboxilasa, respectivamente (Buechler y col., 2011). La interacción adiponectina-AdipoR1 también disminuye la vía de la gluconeogénesis mediante la inhibición de las enzimas hepáticas fosfoenolpiruvato carboxicinas y glucosa-6-fosfatasa, y al mismo tiempo incrementa la señalización de la insulina de manera directa al interaccionar con su ligando natural e indirectamente mediante la disminución del contenido tisular de triglicéridos (Finelli y Tarantino, 2013).

A nivel de endotelio vascular AdipoR1 inhibe los procesos de inflamación y aterosclerosis porque suprime la adhesión de los monocitos a las células endoteliales (Milosz y col., 2007), a través de la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión tales como la molécula de adhesión a células vasculares 1 y la molécula de adhesión intracelular 1 (VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente por sus siglas en inglés), esta regulación está mediada por la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa (citocina proinflamatoria) y ésta a la vez por una disminución de la actividad del factor nuclear κ B, lo que interrumpe la formación de células espumosas derivadas de macrófagos y la aparición de enfermedad vascular en músculo liso (Milosz y col., 2007; Plant y col., 2008).

VCAM-1 es una glicoproteína transmembranal inducible de la familia de las inmunoglobulinas, se expresa en varios tipos de células y juega un papel importante en una serie de respuestas inflamatorias e inmunes (Jaitovich y Etcheverry, 2004). El nombre de sVCAM-1 hace referencia a la forma soluble (circulante) de VCAM-1, la cual es liberada del endotelio activado a circulación mediante un proceso proteolítico, se encuentra elevada en estados de

obesidad, hipertensión, DM2 y aterosclerosis, y por ello los niveles circulantes de esta molécula reflejan el grado de activación e inflamación endotelial, así como su expresión en la superficie de endotelio por lo que se considera como un biomarcador de daño endotelial (Milosz y col., 2007).

Las micropartículas (MP) son una población heterogénea de microfragmentos membranales secretados hacia diferentes fluidos corporales las cuales son liberadas de la membrana plasmática de diferentes tipos celulares como plaquetas, monocitos, linfocitos, eritrocitos, neutrófilos y células endoteliales (Morel y col., 2011). Las MP endoteliales (EMP, por sus siglas en inglés) son estructuras vesiculares complejas que se desprenden de las células del endotelio en procesos de activación o apoptosis temprana (Dignat-George y Boulanger, 2011). En realidad, las EMP no sólo constituyen un marcador emergente para evaluar lesión o disfunción endotelial sino que también se considera que desempeñan un importante papel biológico en la inflamación, la lesión vascular, angiogénesis y la trombosis (Chironi y col., 2009).

Son pocos los estudios en los cuales se analice la expresión de AdipoR1 a nivel de superficie celular tanto en sujetos sanos como en pacientes con algún estado patológico en el que esté comprometido el equilibrio óptimo del funcionamiento del endotelio vascular; por lo tanto este proyecto planteó llevar a cabo un análisis de los niveles de la adiponectina y del receptor AdipoR1 en MP y EMP circulantes en plasma de pacientes con DM2 para evaluar su asociación con la concentración de sVCAM-1. Estos resultados permiten entender y suponer cómo la disminución de los niveles de la adiponectina o el receptor AdipoR1 a nivel endotelial podría afectar la concentración en plasma de moléculas de adhesión como la sVCAM-1, la cual se encuentra elevada en estados asociados con la DM2 como la inflamación y activación del endotelio vascular.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Generalidades de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la presencia de defectos a nivel de síntesis, secreción o acción de la insulina, que conducen a un estado de hiperglicemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (American Diabetes Association, 2014). Dentro de la clasificación de la DM las dos categorías más amplias se designan como DM tipo 1 y DM tipo 2. La DM tipo 2 (DM2) conocida anteriormente como “diabetes mellitus no insulino dependiente” es el tipo más común de diabetes en México y a nivel mundial y se caracteriza por presentar diferentes niveles de resistencia a la insulina (International Diabetes Federation, 2013). La insulina es una hormona que se produce en el páncreas específicamente en los islotes de Langerhans y es encargada de inducir la internalización de la glucosa en la célula (Lotfy y col., 2011). Este tipo de DM representa más del 90 % del total de todos los casos de diabetes y su evolución conlleva a la aparición de complicaciones de carácter microvascular y macrovascular (International Diabetes Federation, 2013).

Epidemiología

La DM ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas y es actualmente una de las enfermedades no transmisibles más comunes a nivel mundial (International Diabetes Federation, 2013; World Health Organization, 2013). Según la Federación Internacional de la Diabetes (FID) se estima que la DM es la cuarta o quinta causa de muerte en la mayoría de los países de altos ingresos y además existen pruebas sustanciales de que este padecimiento es

una epidemia en muchos países en vías de desarrollo debido a que el 80% de las personas con DM viven en países de bajos y medianos ingresos. Según la FID se estimó en el 2013 que la prevalencia de DM en el mundo era del 8.3 %, cifra que equivale a más de 387 millones de casos de los cuales se considera que el 46.3 % pertenece a un grupo de sujetos con DM pero que permanecen sin diagnosticar. También se estimó que para el año 2035 la prevalencia mundial aumente a 592 millones de personas con DM, es decir un aumento igual o mayor al 55 % de la prevalencia actual (International Diabetes Federation, 2013).

México se encuentra entre los 10 países con mayor prevalencia en número de habitantes con DM en el mundo pues ocupa el sexto lugar de la lista con una cifra de 11.7 % de la población mexicana y un total de 8.7 millones de casos; el país que cuenta con más habitantes con DM2 es China con un total 98.4 millones de casos y una prevalencia del 9.62 % de la población total, le sigue la India con un total de 65.1 millones (8.56 %) y en tercero se encuentran los Estados Unidos de América con una cifra de 24.4 millones de casos (10.9 %) (Tabla I) (International Diabetes Federation, 2013). En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el 2012 la proporción de adultos (20 años de edad o más) con diagnóstico médico previo de DM fue de 9.2 %, lo que representa un aumento de un 2.2 % en comparación al 7 % obtenido en el 2006 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012).

En la república mexicana, la prevalencia más alta por entidad federativa en el periodo del 2006 al 2011 se mostró en el Distrito Federal y las entidades de Durango, Estado de México, Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz con una escala de 10.2 a 12.3 %, mientras que el estado de Sonora, junto con Guerrero, Jalisco, Nayarit y Tlaxcala ocupó el penúltimo lugar en la escala con una prevalencia de 7.7 a 8.1 % de la población total del estado (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012).

Tabla I. Principales países/territorios con DM2 en 2014 y estimación para 2035.

País/ Territorio	2014 Millones	País/ Territorio	2035 Millones
1 China	98.4	1 China	142.7
2 India	65.1	2 India	109.0
3 Estados Unidos de América	24.4	3 Estados Unidos de América	29.7
4 Brasil	11.9	4 Brasil	19.2
5 Federación de Rusia	10.9	5 México	15.7
6 México	8.7	6 Indonesia	14.1
7 Indonesia	8.5	7 Egipto	13.1
8 Alemania	7.6	8 Pakistán	12.8
9 Egipto	7.5	9 Turquía	11.8
10 Japón	7.2	10 Federación de Rusia	11.2

Territorios en número de personas con DM2 en un promedio de 20 a 79 años de edad, en el año 2014 y estimación para el año 2035.

Adaptado de International Diabetes Federation, 2013.

Etiología

La DM2 es una enfermedad metabólica multifactorial causada por una compleja interacción entre la predisposición genética y factores asociados al estilo de vida (Park, 2011). Los factores asociados al estilo de vida, por ejemplo el aumento de la ingesta calórica en la dieta, la inactividad física o la obesidad, sin duda contribuyen a la prevalencia reciente de la DM2 (Ventura y col., 2009; Hu, 2011); sin embargo los factores genéticos son también una variable determinante en la susceptibilidad individual a esta enfermedad (Park, 2011).

Factores genéticos. Aunque en la actualidad el aumento de la prevalencia de DM2 se debe principalmente a cambios en el estilo de vida, existen factores genéticos determinantes que contribuyen a la susceptibilidad a esta enfermedad (Kim y col., 2011). La importancia de estos factores se apoya en que existen diferencias en la prevalencia de la DM2 de acuerdo a la etnicidad de la población; un ejemplo de ello es un estudio llevado a cabo en una población de indios Pima que residen en los Estados Unidos, los cuales se reporta que tienen un riesgo por lo menos dos veces mayor de padecer DM2 en comparación con la población americana en general (Cusi y Ocampo, 2011; Imaura y Maeda, 2011); de igual forma se ha reportado que la población latina que reside en los Estados Unidos tiene una incidencia dos veces mayor en comparación con los nativos americanos que tienen origen europeo (Cusi y Ocampo, 2011). La ascendencia directa de los padres es otro factor importante, pues se ha observado que los hijos de padres con DM2 pueden llegar a tener hasta un 40% de probabilidad de padecer la enfermedad en comparación con una población sin antecedentes familiares, la cual posee un riesgo del 7% (Imamura y Maeda, 2011; Park, 2011).

Se han identificado diversas variantes de secuencia de ADN que influyen en la predisposición individual a la DM2 y rasgos relacionados a esta tales como

glucosa en ayuno e índice de masa corporal (Imamura y Maeda, 2011). Diversos estudios han aportado un avance significativo en el campo de la genética de algunas enfermedades comunes, sin embargo estos avances no proporcionan por sí solos suficiente información para mejorar el diagnóstico y tratamiento de la DM2 (Imamura y Maeda, 2011). Con la aplicación de distintas estrategias de mapeo genómico se han identificado genes de susceptibilidad para el desarrollo de la DM2, entre los más importantes están el gen para el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés), el gen para la calpaina-10, el gen TCFL2, CDKAL1 y IGF2BP2, así como también el gen de la adiponectina entre algunos otros (Goldstein y Müller-Wieland, 2003; Chauhan y col., 2010; Imamura y Maeda, 2011).

Factores asociados al estilo de vida. La DM2 es una crisis de salud pública mundial impulsada por la rápida urbanización y el estilo de vida “occidental” el cual se encamina cada vez más al sedentarismo. Estudios epidemiológicos y ensayos clínicos aleatorios muestran que la DM2 se puede prevenir mediante modificaciones en el estilo de vida, son factores de riesgo modificables para el desarrollo de la DM2 el sobrepeso y obesidad, la calidad de la dieta (carga glucémica, ingesta de grasa, fibra y alimentos integrales), la inactividad física, el consumo de alcohol y el tabaquismo (Hu, 2011).

La obesidad ha sido reconocida como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DM2, puesto que varios estudios prospectivos en poblaciones muy diferentes han demostrado una fuerte asociación positiva entre el índice de masa corporal (IMC) y el aumento de peso con el posterior desarrollo de la DM2. Al mismo tiempo, en muchos de estos estudios se establece que la pérdida de peso puede tener importantes efectos benéficos sobre el control glicémico y por tal motivo del riesgo a un próximo diagnóstico de DM2 en personas con sobrepeso u obesidad (Bazzano y col., 2005).

La dieta es uno de los principales factores de riesgo modificables para el desarrollo de la DM2 y aunque la ingesta excesiva de calorías es un factor impulsor importante para la diabetes, la calidad de las grasas y carbohidratos en la dieta juegan un papel importante independiente del IMC. En particular una dieta con una alta carga glicémica aumenta la demanda de insulina y puede llevar al agotamiento de las células beta del páncreas, lo que implica a largo plazo un riesgo para el desarrollo de DM2 y enfermedad cardiovascular (Ventura y col., 2009; Hu, 2011).

Estudios en animales demuestran que las grasas monoinsaturadas o poliinsaturadas parecen tener efectos benéficos sobre la acción de la insulina, mientras que las grasas saturadas y en general las dietas con alto contenido de grasas totales parecen disminuir la sensibilidad de la misma. El estilo de vida sedentario es un factor de riesgo para la diabetes debido a que se ha demostrado que las personas con un estilo de vida físicamente activo tienen una respuesta menos exacerbada de la concentración de insulina plasmática en respuesta a una carga de glucosa debido a que ejercicio promueve un aumento de la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Hu, 2011).

El tabaquismo es un factor de riesgo independiente para la DM2, se describe que los fumadores tienen mayor riesgo de desarrollar DM2 en comparación con los no fumadores (Willi y col., 2007). Esto sucede porque a pesar de que los fumadores pueden llegar a ser más delgados que los no fumadores, esta población se asocia con un mayor riesgo de obesidad central, además que el tabaquismo tiene efectos antiestrogénicos en las mujeres y disminuye la testosterona en plasma en los hombres; efectos que pueden favorecer la resistencia a la insulina y la aparición de la DM2 (Hu, 2011). Otro factor relacionado a la diabetes es el consumo de alcohol, existen posibles efectos benéficos del consumo moderado de alcohol los cuales incluyen una mejora a la sensibilidad de la insulina, aumento del HDL-colesterol y adiponectina (Koppes y col., 2005). Sin embargo su consumo excesivo tiene

varios efectos metabólicos entre los cuales se encuentra la obesidad, el aumento de los niveles de triglicéridos, pancreatitis, alteraciones del metabolismo de los carbohidratos y el deterioro de la función hepática (Koppes y col, 2005; Hu, 2011).

Patogenia

En respuesta a una ingesta de carbohidratos los individuos con un metabolismo normal de la glucosa presentan un perfil plasmático de insulina, glucosa y glucagón que después de dicha ingestión se observa con un aumento en los niveles de glucosa, una sólida respuesta de insulina para disponer a nivel celular de la carga de glucosa ingerida y una interrupción en la secreción de glucagón en plasma. Ésta interacción permite que la glucosa plasmática permanezca dentro de un intervalo homeostático muy estrecho a pesar de la variación en la ingesta de alimentos que se produce entre el ayuno y el estado postprandial, de tal forma que tanto la insulina como el glucagón representan un conjunto clave de hormonas que están implicadas en la regulación de la respuesta metabólica de la glucosa (Spellman, 2010).

Un factor muy importante para la comprensión de la regulación defectuosa de la glucosa en la DM2 es la resistencia a la insulina, que se define como una condición clínica caracterizada por una disminución de la sensibilidad y capacidad de respuesta a las acciones metabólicas de la hormona insulina por parte de los tejidos (Ginsberg, 2000). La falta de sensibilidad a la insulina provoca el inicio y la generación de un estado conocido como hiperinsulinemia debido a que se produce un aumento compensatorio en la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas en un intento por mantener una tolerancia a la glucosa normal (Mercurio y col., 2012). La hiperinsulinemia es una de las principales características de la resistencia a la insulina y ésta última de varias condiciones patológicas tales como obesidad, DM2 y síndrome

metabólico; también la resistencia a la insulina representa la anomalía más tempranamente detectable en la historia natural de la DM2 cuya evolución implica defectos en la síntesis y secreción de la hormona insulina (Mercurio y col., 2012).

La resistencia a la insulina se manifiesta sobre todo en tejidos periféricos como músculo esquelético y tejido adiposo con una tasa baja de captación y oxidación de moléculas de glucosa. El mecanismo compensador asociado a la hiperinsulinemia se traduce en el evento por el cual el individuo es capaz de mantener una tolerancia normal a la glucosa durante períodos finitos de tiempo, cuando dicho mecanismo de control homeostático es insuficiente (probablemente por causas asociadas a defectos de la síntesis y/o secreción hormonal) sobreviene la intolerancia a la glucosa y en consecuencia el desarrollo de la DM2 (Pérez, 2009).

Complicaciones Vasculares

Las manifestaciones clínicas de la DM2 son variadas y en muchas ocasiones inespecíficas, aunque la mayoría de los signos y síntomas están relacionados con la hiperglicemia sostenida o la resistencia a la insulina, las primeras manifestaciones de la DM2 tienden a aparecer durante la edad adulta después de la tercera década de vida y son mucho más discretas que las que se presentan en la DM1, de hecho un alto porcentaje de pacientes son asintomáticos y tan sólo exhiben altas concentraciones de glucosa en plasma (Díaz y col., 2004). Las complicaciones en los pacientes con DM2 pueden ser agudas o crónicas pero es poco frecuente que la primera manifestación sea un cuadro agudo de descompensación como por ejemplo una cetoacidosis o un coma hiperosmolar, generalmente al paciente diabético se le identifica cuando manifiesta alguna complicación crónica de la enfermedad como por ejemplo la neuropatía diabética (Díaz y col., 2004).

En la actualidad las complicaciones agudas derivadas de este padecimiento han dejado de ser la principal causa de muerte por lo que ahora el paciente con DM2 presenta una mayor longevidad, sin embargo debe enfrentarse a las complicaciones crónicas que involucra este padecimiento. Estas complicaciones dependiendo de si afectan los vasos capilares sanguíneos pequeños o de mayor calibre se clasifican en microvasculares y macrovasculares, respectivamente (Díaz y col., 2004).

Las complicaciones microvasculares se relacionan principalmente con daño al endotelio y al músculo liso de la microvasculatura y se manifiestan como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética las cuales están estrechamente relacionadas con la edad, duración de la diabetes y el control glicémico (Díaz y col., 2004). Las complicaciones macrovasculares son las más comunes en la DM2 e incluyen a un grupo de trastornos que se caracterizan por la presencia de aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón en todas sus modalidades y ésta última la principal causa de morbilidad y mortalidad además de ser el mayor contribuyente a los costos directos e indirectos de la DM2 (Figura 1) (International Diabetes Federation, 2014).

Disfunción Endotelial en la DM2

En individuos sanos el endotelio vascular regula un complejo equilibrio de los factores que mantienen la homeostasis vascular y la función arterial normal (Roberts y Porter, 2013). Una interrupción funcional del endotelio se conoce como un evento temprano que subyace en el desarrollo posterior de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis (Tabit y col., 2010). La creciente epidemia mundial de DM2 es un problema importante que confiere un riesgo significativamente mayor de padecer enfermedad cardiovascular además de la presencia disfunción endotelial (Roberts y Porter, 2013).

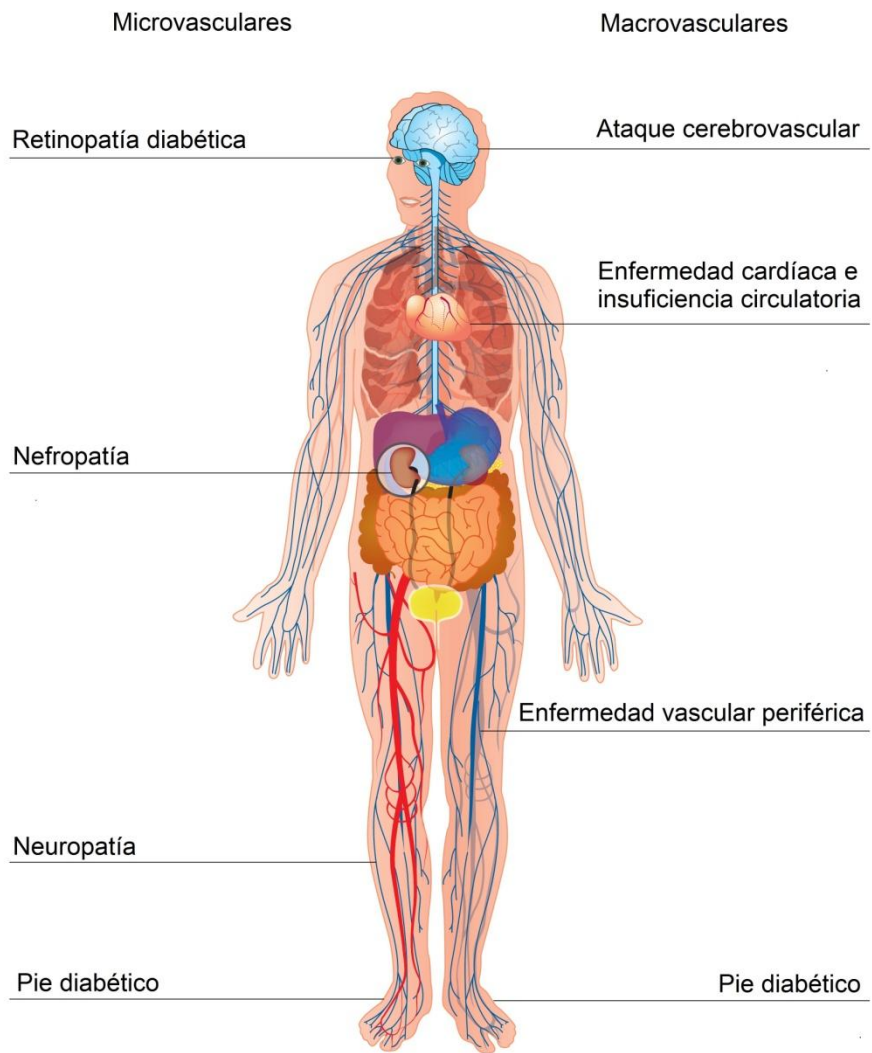


Figura 1. Complicaciones microvasculares y macrovasculares en la DM2.
Adaptado de International Diabetes Federation, 2013

Dentro de ese intricado equilibrio que existe entre la sangre y los tejidos circundantes, el endotelio forma una monocapa que comprende a su vez la capa más interna de los vasos sanguíneos (Michiels, 2003). Durante las últimas décadas se ha demostrado que el endotelio es una membrana semipermeable que ejerce un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis vascular, facilita el paso de sustancias tales como nutrientes y leucocitos a través de la pared del vaso y segrega numerosos mediadores necesarios para el funcionamiento normal vascular, incluyendo los que regulan el tono vascular, la coagulación, la modulación de la respuesta inmune y el control de crecimiento celular vascular (Roberts y Porter, 2013).

El óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) es uno de los factores derivados de endotelio más importantes debido a que desempeña múltiples funciones en la prevención de la formación de ateroma (Roberts y Porter, 2013). Es producido por la enzima sintasa óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) y se difunde en las células del músculo liso vascular vecinas para mediar la vasodilatación vascular (Tabit y col., 2010). El NO inhibe la agregación plaquetaria y la transcripción a nivel nuclear de moléculas de adhesión de leucocitos como lo es la molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés) (Roberts y Porter, 2013).

Las moléculas de adhesión son receptores de membrana que intervienen en diversas funciones relacionadas con el tráfico celular, con interacciones entre células y con la adhesión de células a la matriz extracelular (Biesiada y col., 2009). Las moléculas de adhesión participan en procesos tan variados como crecimiento, diferenciación, migración y apoptosis (Jaitovich y Etcheverry, 2004). De la superfamilia de inmunoglobulinas se clasifican tres grupos; VCAM-1, ICAM-1 y 2 y PECAM-1 (molécula de adhesión plaquetaria 1, por sus siglas en inglés). La VCAM-1 se expresa en la superficie endotelial y participa en la extravasación leucocitaria particularmente de linfocitos, basófilos, eosinófilos y monocitos; mientras que las ICAM-1 y 2 se expresan en el endotelio, linfocitos y

otros leucocitos, y se relacionan principalmente con el tráfico leucocitario a través de diferentes tejidos mediante la interacción con las integrinas $\beta 2$ (Biesiada y col., 2009).

La disfunción endotelial se refiere a la incapacidad del endotelio para regular la homeostasis vascular y esencialmente se describe como el “retorno” del equilibrio fisiológico en favor de los efectos vasoconstrictores, proinflamatorios y protrombóticos que promueven la aterosclerosis. Tales anomalías en la función endotelial pueden ser detectadas precozmente en el desarrollo de enfermedad cardiovascular antes de que los síntomas clínicos sean evidentes (Roberts y Porter, 2013).

La disfunción endotelial es un término que generalmente se refiere a la reducción de la biodisponibilidad de NO ocasionada por una disminución de la expresión y activación de eNOS (Tabit y col., 2010). Existen muchos mecanismos propuestos para explicar la relación de la DM2 con la alteración de la vasodilatación de endotelio que se observa en dichos pacientes, sin embargo estos mecanismos aún no están claramente descritos y se menciona que posiblemente se deba a que los pacientes con DM2 suelen mostrar múltiples desequilibrios homeostáticos además de la hiperglicemia crónica y por lo tanto se infiere que dichas alteraciones inducen disfunción endotelial independientemente de la presencia de DM2 lo que indica una etiología multifactorial además de la hiperglicemia “per se” (Hamburg y col., 2008).

Además de participar en la homeostasis de la glucosa la insulina activa vías de señalización intracelular involucradas en el mantenimiento del endotelio, una de las más importantes vías vasoprotectoras es la vía de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) la cual promueve la captación de glucosa y un aumento en la producción de NO a través de la expresión y activación de la eNOS (Figura 2) (Roberts y Porter, 2013). En circunstancias fisiológicas predomina sobre otras vías la PI3K que regula el adecuado equilibrio de los

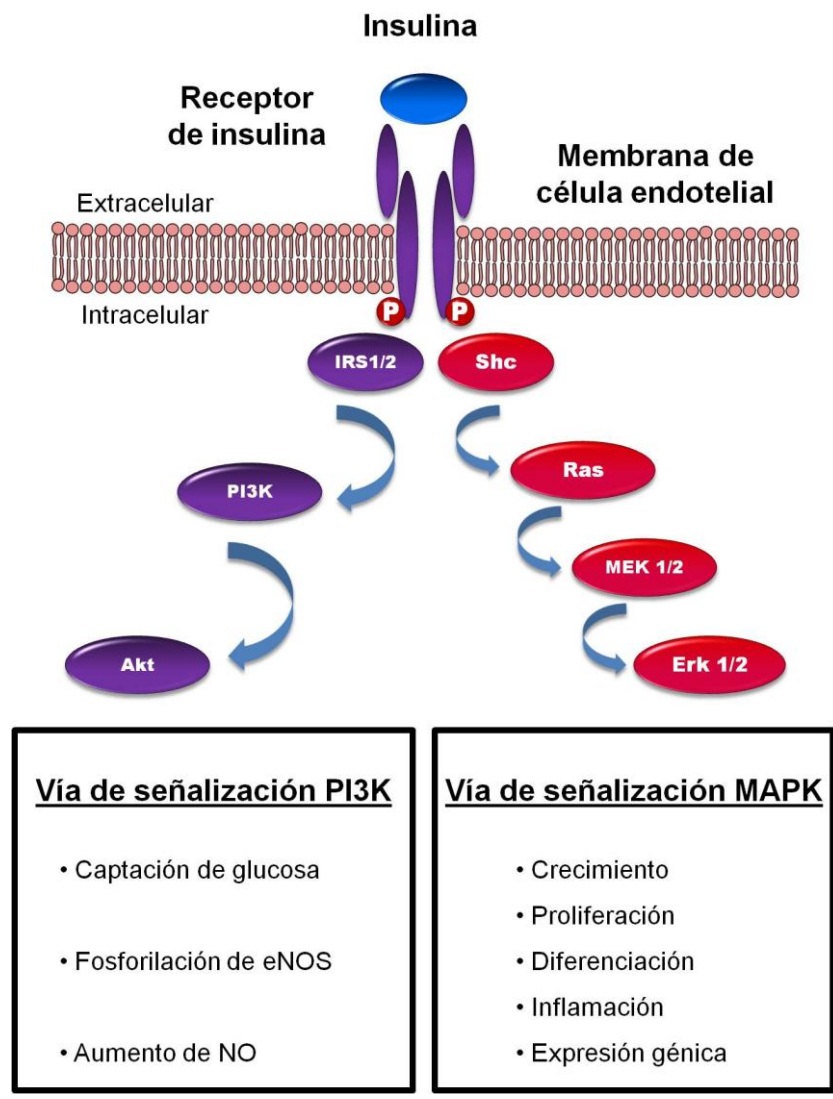


Figura 2. Principales vías de señalización intracelular de la insulina.

En condiciones fisiológicas predomina la activación de PI3K y un efecto de carácter antiaterogénico. En la resistencia a la insulina la deficiencia selectiva de la vía PI3K conduce a un predominio de la activación de la vía MAPK cuyos efectos son predominantemente proaterogénicos.

(IRS 1/2, sustrato del receptor de insulina 1 y 2; Akt, proteína cinasa B; Shc, proteína cinasa Shc; Ras, proteína cinasa Ras; MEK 1/2 proteína cinasa MEK 1 y 2; Erk 1/2 receptor cinasa extracelular 1 y 2).

Adaptado de Roberts y Porter, 2013.

vasos sanguíneos pero se ha observado en diversos estudios que en estados de resistencia a la insulina (característica de la DM2) existe una disminución selectiva de la vía PI3K que no afecta la selección de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) también llamada como vía de las MAP cinasas (Cusi y col., 2000).

La disminución selectiva de PI3K provoca una disminución de la actividad de la enzima eNOS mientras que la estimulación de la vía MAPK provoca un incremento en la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B, por sus siglas en inglés) y por lo tanto la inducción de estrés oxidativo, incremento en la expresión de las moléculas de adhesión y aumento de la resistencia a la insulina, además de que se reduce la captación de glucosa mediada por PI3K lo que aumenta la persistencia de un estado de hiperinsulinemia que a la vez favorece aún más la aparición de un estado de señalización proaterogénico con deficiente producción de NO (Cusi y col., 2000).

Por otra parte se ha demostrado que existe una amplia gama de estímulos nocivos como citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores de transcripción que contribuyen a las complicaciones vasculares en la DM2 (Vozarova y col., 2001). En modelos animales con obesidad, se ha identificado al tejido adiposo como un sitio de producción de citocinas proinflamatorias en particular el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés) (Roberts y Porter, 2013). TNF- α activa al NF- κ B, un factor de transcripción capaz de estimular en mayor medida la expresión de genes inflamatorios. El NF- κ B también es activado por ácidos grasos libres (AGL) y por el receptor para productos de glicación avanzada (AGES, por sus siglas en inglés), ambos incrementados en la DM2. La evidencia sugiere que la sobre expresión de TNF- α interviene en el desarrollo de un estado de resistencia a la insulina debido a que los ratones obesos “knock out” para el gen de TNF- α mejoran significativamente la sensibilidad a la insulina (Tabit y col., 2010; Roberts y Porter, 2013).

Existe una gran cantidad de evidencia de que la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) es una enzima que está implicada como uno de los principales contribuyentes a la disfunción endotelial observada en la DM2 (Das Evcimen y King, 2007). PKC es activada por diacilglicerol y se ha identificado en modelos animales con diabetes que tras la activación de PKC se inducen efectos intracelulares y alteraciones que incluyen la expresión amplificada de VCAM-1 y una consecuente liberación de sVCAM-1 en plasma (Das Evcimen y King, 2007). VCAM-1 en su forma circulante en plasma se conoce con el nombre de sVCAM-1 (forma soluble); esta molécula es liberada del endotelio vascular activado por procesos que involucran enzimas proteolíticas. La sVCAM-1 se encuentra elevada en la obesidad, hipertensión, DM2 y aterosclerosis, y por lo tanto funge como un reflejo del grado de activación e inflamación endotelial, así como de su expresión en la superficie del endotelio (Milosz y col., 2007).

AdipoR1

AdipoR1 es uno de los dos receptores conocidos para la adiponectina, una hormona proteica sintetizada y secretada principalmente por el tejido adiposo, que ejerce un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa y lípidos (Arita y col., 1999; Kadowaki y Yamauchi, 2005). Se ha descrito que la adiponectina se une a sus receptores AdipoR1 y AdipoR2 a través de su dominio globular ya sea en forma de trímero, hexámero o multímero y activa rutas de señalización que promueven la captación de glucosa, disminuye la vía de la gluconeogénesis y aumenta la oxidación de los ácidos grasos en células hepáticas y de músculo esquelético (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Li y col., 2009).

Estructura y Función

AdipoR1 es una proteína compuesta por 375 aminoácidos, está codificada en el cromosoma 1 y su “locus” es 1p36 (Yamauchi y col., 2003). Comparte con el receptor AdipoR2 una homología del 66.7% y ambos se diferencian de los receptores acoplados a proteínas G debido a que presentan siete dominios transmembranales pero con un extremo carboxilo terminal extracelular y un extremo amino terminal intracelular (Figura 3) (Kadowaki y Yamauchi, 2005). AdipoR1 se ha observado de manera ubicua en el organismo pero mayoritariamente en células de músculo esquelético y a través de la unión con su ligando estimula la activación de la vía de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés), la vía de MAPK y la vía del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés) (Buechler, 2011; Kiezun y col., 2013).

Vías de Señalización de AdipoR1

La proteína adaptadora con interacción de fosfotirosina, dominio PH (homólogo a plectrina) y cremallera de leucina 1, mejor conocida como “APPL1” es la primera proteína identificada que interactúa directamente con los receptores de la adiponectina (Mao y col., 2006). APPL1 es una proteína con múltiples dominios funcionales de los cuales el dominio de unión a fosfotirosinas es el que interactúa directamente con la región intracelular de los receptores AdipoR1 y R2 (Figura 4). APPL1 ejerce una importante función en la vía de señalización de la insulina, por lo que es considerada como un mediador importante de sensibilidad a la insulina dependiente de adiponectina en células de músculo esquelético (Schmid y col., 2013). La presencia de la proteína APPL1 es necesaria para que la adiponectina ejerza sus efectos antiinflamatorios y crioprotectores sobre células endoteliales a través de la unión al receptor

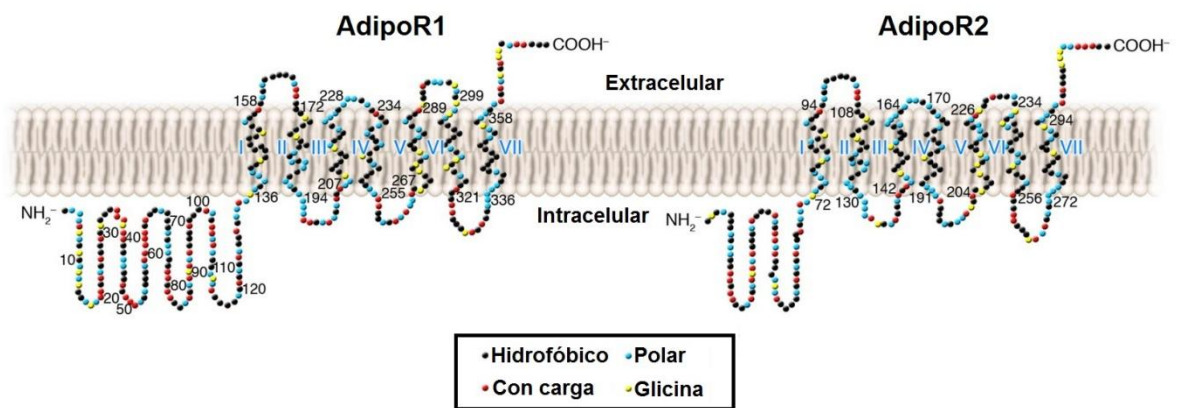


Figura 3. Estructura de los receptores de adiponectina.

AdipoR1 y AdipoR2 (66.7% de homología con AdipoR1) presentan siete dominios transmembranales, pero son estructuralmente distintos a los receptores acoplados a proteínas G.

Adaptado de Kadowaki y Yamauchi, 2005.

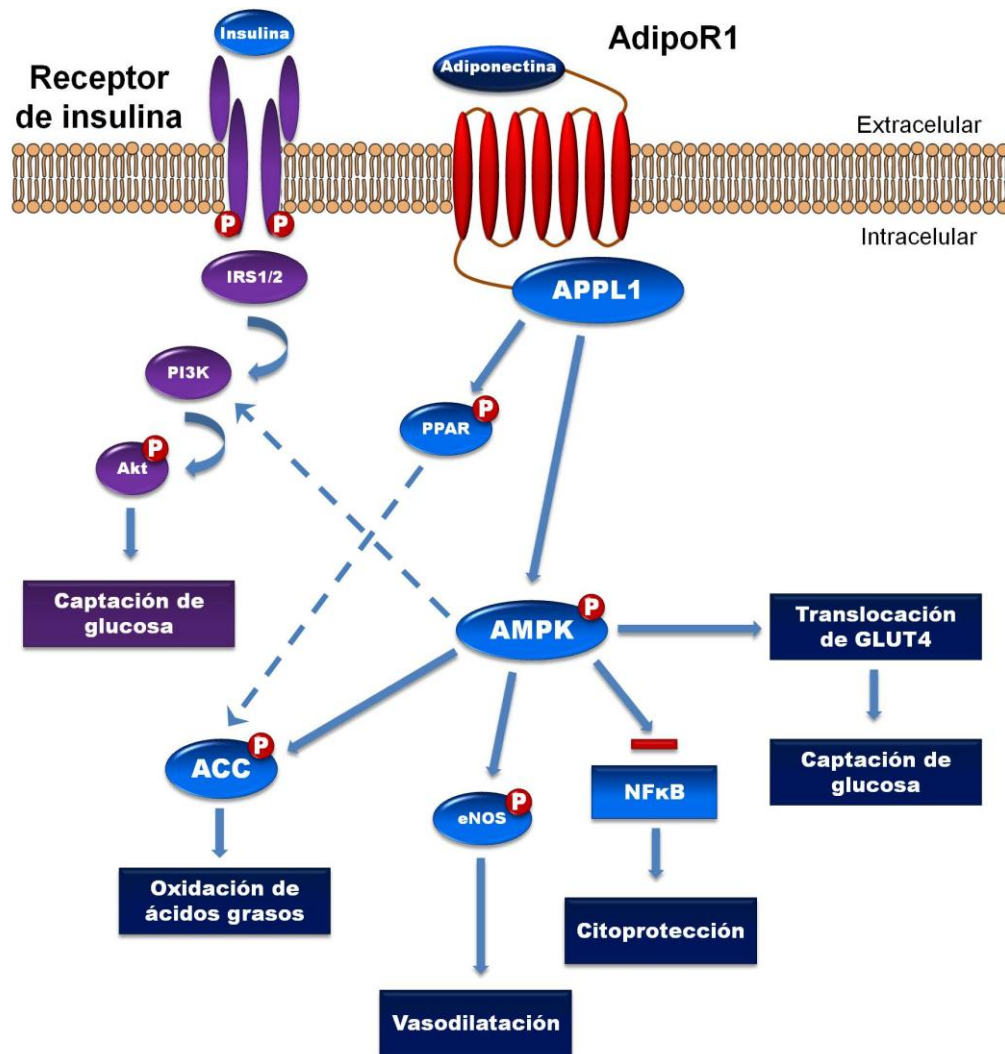


Figura 4. Señalización de adiponectina con su receptor AdipoR1.

AMPK interactúa con la vía de PI3K que favorece la captación de glucosa, promueve la translocación de GLUT4, aumenta la oxidación de los ácidos grasos mediante la inactivación de la enzima ACC al igual que PPAR y favorece un estado de vasodilatación y citoprotección a través de la activación de la enzima eNOS y la inhibición de NF-κB respectivamente.

(ACC, acetil CoA carboxilasa)

Adaptado de Deepa y Dong, 2009.

AdipoR1 (Xin y col., 2011)

Se ha descrito que la adiponectina a través de AdipoR1 y APPL1 ejerce un papel importante en la transducción de señales en diferentes tejidos, participa no sólo en células de músculo esquelético sino también en hígado, endotelio vascular, tejido adiposo, hipotálamo, hueso, riñón, entre otros (Deepa y Dong, 2009). Dicha transducción de señales es llevada a cabo principalmente a través de la activación de AMPK, considerándose como un paso clave para mediar los efectos de la adiponectina ya que la AMPK es conocida como un sensor importante de la homeostasis energética (Hardie, 2007). De tal manera, que mediante la activación de la AMPK se inhiben procesos involucrados en el consumo energético como la biosíntesis, el crecimiento celular y la proliferación, mientras que se activan vías catabólicas para la generación de energía (Deepa y Dong, 2009).

Músculo esquelético. AdipoR1 es el receptor de la adiponectina más abundantemente en músculo esquelético, uno de los principales tejidos diana de la hormona insulina. La mayoría de los efectos de la adiponectina en músculo esquelético están mediados por la fracción globular de esta adipocitocina puesto que esta fracción presenta una mayor afinidad por AdipoR1 (Yamauchi y col., 2003). Se ha observado que en células C2C12 (línea celular de mioblastos de ratón), la adiponectina activa las vías de la AMPK, p38 MAPK (una de las vías de las MAP cinasas) y aumenta la actividad de PPAR (Yamauchi y col., 2003).

La AMPK es un sensor clave del estado energético celular y su activación mediada por la adiponectina en el músculo esquelético aumenta la captación de glucosa, oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato (Yamauchi y col., 2002). p38 MAPK regula diversos procesos celulares como diferenciación, crecimiento, inflamación y muerte celular, y se activa en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares que incluyen el estrés metabólico (Ono y

Han, 2000). Diversos estudios han observado que en mioblastos C2C12 la oxidación de ácidos grasos mediada por la adiponectina no está dada exclusivamente por activación de AMPK, sino también por p38 MAPK y la activación de PPAR, el cual es conocido como un importante regulador de la β oxidación de ácidos grasos en células C2C12 (Yamauchi y col., 2003; Yoon y col., 2006).

La adiponectina disminuye el nivel de glucosa en sangre y protege contra la obesidad que aparece durante el desarrollo de la resistencia a la insulina (ver Figura 4). Este efecto es llevado a cabo principalmente por la regulación de la translocación a membrana de GLUT4 mediada por AMPK tanto de la adiponectina de longitud completa como de la fracción globular (Yamauchi y col., 2003). Mientras que la sobreexpresión de APPL1 mejora la translocación de GLUT4 a membrana, la supresión de esta proteína la reduce significativamente en células C2C12 y L6 (línea celular de músculo de ratón) (Mao y col., 2006;). La translocación de GLUT4 también es activada en menor proporción por Rab5 (proteína perteneciente a la superfamilia de GTPasas), ya que estudios han observado que la interrupción de la interacción de APPL1 con Rab5 también disminuye la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular (Schmid y col., 2013).

Hígado. En hígado la activación de AMPK disminuye la vía de la gluconeogénesis, atenúa el nivel de expresión de enzimas como fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa-6-fosfatasa (PEPCK y G6Pasa respectivamente, por sus siglas en inglés) por lo que reduce el nivel de glucosa “in vivo” (Yamauchi y col., 2002). Se ha observado en hepatocitos que la inducción de sobreexpresión de ambos receptores para adiponectina en ratones deficientes de RNAm para AdipoR1 y R2, mejora notablemente la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina que presentan estos animales (Finelli y Tarantino, 2013). AdipoR1 activa a AMPK, reduce la producción de glucosa

hepática y aumenta el catabolismo de los ácidos grasos, mientras que AdipoR2 activa la vía de PPAR, lo que aumenta la oxidación de ácidos grasos e inhibe la inflamación y el estrés oxidativo (ver Figura 4) (Buechler y col., 2011).

Con base en lo anterior, AdipoR1 y R2 en hepatocitos difieren en sus vías de señalización. De acuerdo con ciertos hallazgos, ratones “knock out” para el gen de AdipoR1 han mostrado un aumento de la expresión de las enzimas PEPCCK y G6Pasa que se traduce en un aumento de la vía de la gluconeogénesis, además de mostrar intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Por otro lado, ratones “knock out” para AdipoR2 también presentan resistencia a la insulina, pero presentan una síntesis de glucosa a nivel hepático normal y permanecen resistentes a un estado de obesidad inducido mediante una dieta alta en grasas (Yamauchi y col., 2007).

Tejido adiposo. El tratamiento con adiponectina globular en modelos murinos aumenta la captación de glucosa mediante la activación de AMPK en los adipocitos (Beylot y col., 2006). En la línea celular de adipocitos 3T3-L1, la sobreexpresión de adiponectina promueve la diferenciación de estas células, aumenta el contenido de lípidos y mejora la sensibilidad a la insulina (Kim y col., 2007; Buechler y col., 2011). Con base en estas observaciones, se sugiere que la adiponectina ejerce efectos autócrinos en los adipocitos, ya que se ha observado que ratones que sobreexpresan adiponectina presentan un mayor contenido de tejido adiposo en comparación con ratones con niveles de expresión normales (Kim y col., 2007). Esto se traduce en que la adiponectina promueve el almacenamiento de grasa preferentemente en tejido adiposo y de ese modo aumenta la sensibilidad a la insulina en otros tejidos (Kim y col., 2007). Además, se sabe que en células 3T3-L1, la proteína APPL1 está involucrada junto con AdipoR1 en la señalización de insulina, la translocación de GLUT4 a membrana y por lo tanto la captación de glucosa (ver Figura 4) (Kim y col., 2007; Saito y col., 2007).

Endotelio vascular. La disminución del nivel de adiponectina circulante en plasma se correlaciona con inflamación y aumento de la incidencia de enfermedad cardiovascular (Cheng y col., 2007; Galluccio y col., 2008; Nishimura y col., 2008; Plant y col., 2008). El efecto protector de la adiponectina está mediado por el aumento de la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) a través de la activación de la vía de PI3K/Akt, vía AMPK y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) (Galluccio y col., 2008). El NO protege las células endoteliales mediante la inhibición de la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos, la proliferación de células de músculo liso y mediante el aumento de la vasodilatación (Galluccio y col., 2008; Plant y col., 2008; Shibata y col., 2008). AdipoR1 inhibe la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 en la superficie y así suprime la adhesión de monocitos a las células endoteliales, esto lo hace a través de la regulación negativa del TNF- α , que a la vez disminuye la actividad del NF- κ B y con ello la liberación de una gran cantidad de citocinas proinflamatorias (ver Figura 4) (Milosz y col., 2007).

Diversos estudios en donde se ha encontrado que en células endoteliales de la vena umbilical humana, los efectos de la adiponectina están mediados a través de los receptores AdipoR1 y R2, también se ha identificado a APPL1 como la proteína mediadora de los eventos de señalización “rio abajo” de los receptores de la adiponectina para la producción de NO a través de eNOS (Cheng y col., 2007). El papel crítico que desempeña APPL1 en la vasodilatación inducida por adiponectina en estos estudios se demuestra por la incapacidad que se observa por parte de la adiponectina para inducir la producción de NO en células carentes de la proteína adaptadora. La supresión de la expresión de APPL1 da lugar a una disminución significativa en la fosforilación de AMPK, de la eNOS y una disminución en la formación del complejo entre la eNOS y la proteína de choque de térmico 90, disminuyéndose la producción de NO mediada por adiponectina (Cheng y col., 2007).

Además de su efecto protector contra la aterosclerosis, la adiponectina también exhibe efectos antiinflamatorios, especialmente en células endoteliales y macrófagos (Plant y col., 2008). Mientras que la forma de alto peso molecular de la adiponectina (multímero) tiene funciones antiinflamatorias y antiapoptóticas (Kobayashi y col., 2004; Plant y col., 2008), el dominio globular de la adiponectina tiene efectos citoprotectores (Lin y col., 2004; Galluccio y col., 2008). Se considera que existe una relación inversa entre la inflamación y el nivel de adiponectina ya que las enfermedades inflamatorias crónicas tales como enfermedad cardíaca coronaria se caracterizan por una concentración baja de adiponectina y no sólo de la proteína como tal, sino también de sus receptores AdipoR1 y R2 puesto que son regulados negativamente en la inflamación crónica asociada con la diabetes, la obesidad, y la resistencia a la insulina (Nishimura y col., 2008; Shibata y col., 2008; Yilmaz y col., 2008).

Micropartículas

Las micropartículas (MP) son una población heterogénea de pequeñas vesículas (0.1 a 1 μm) provenientes de la membrana plasmática tanto de células vasculares como plaquetas, monocitos, eritrocitos, linfocitos y neutrófilos, que sirven como importantes estructuras de señalización intercelular (Morel y col., 2011). Están compuestas de una bicapa de fosfolípidos que expone proteínas y receptores transmembranales y encierra en su interior componentes citosólicos tales como enzimas, factores de transcripción y ARNm derivado de sus células de origen (Figura 5) (Meziani y col., 2008). Las MP circulan en el torrente sanguíneo y por lo tanto pueden ser detectadas en plasma. Existe una creciente evidencia que sugiere que las MP regulan la inflamación, estimulan la coagulación, afectan las funciones vasculares y la apoptosis, así como también desempeñan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular (Morel y col., 2011).

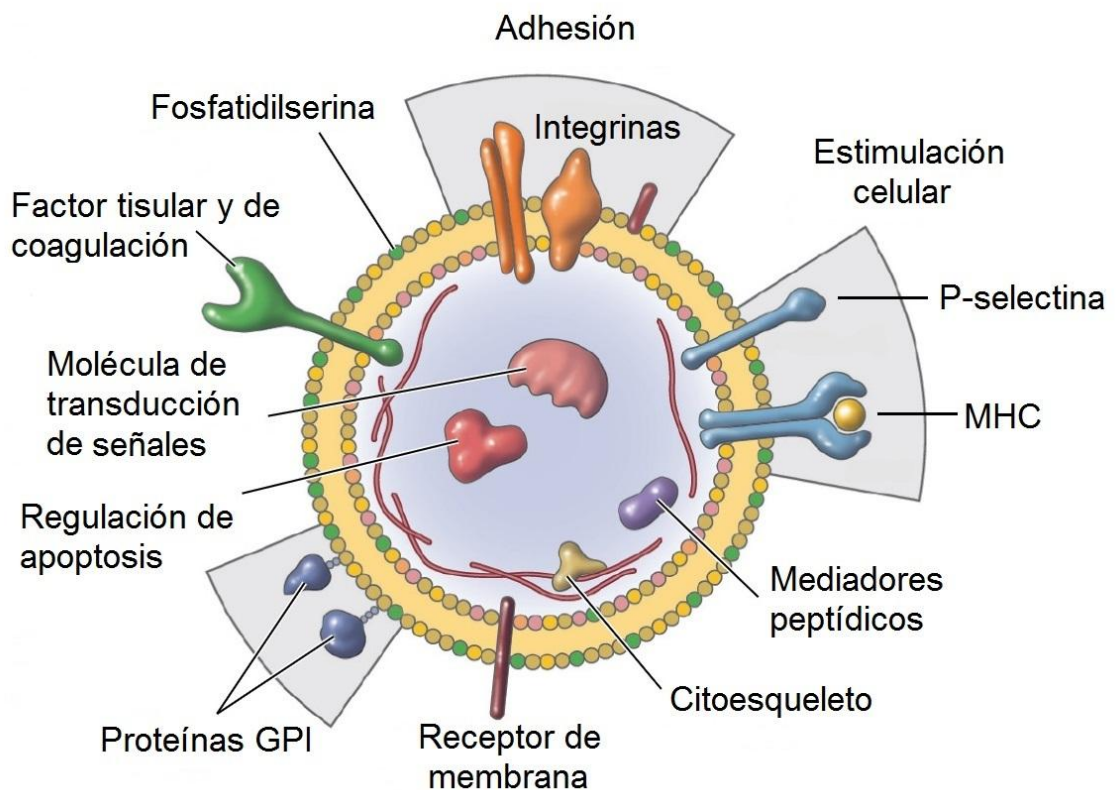


Figura 5. Representación y caracterización estructural de las micropartículas. (MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; GPI, glicosilfosfatidilinositol). Adaptado de Hugel y col., 2005.

En condiciones fisiológicas, se ha informado que más del 80% de las MP expresan antígenos de membrana que le sugieren un origen plaquetario (Flaumenhaft y col., 2009). Señaladamente el aumento de los niveles de MP se ha asociado con trastornos trombóticos y condiciones inflamatorias sistémicas por ejemplo aterotrombosis (Morel y col., 2011). Por lo tanto, la generación prolongada de MP puede ser perjudicial ya que ejercen efectos procoagulantes e inflamatorios significativos que favorecen resultados clínicos adversos en una variedad de enfermedades cardiovasculares. Es importante destacar que las MP circulantes en plasma funcionan como mediadores de la comunicación entre células vecinas (parácrina) y la interacción entre células a distancia (endócrina) (Meziani y col., 2008).

Las MP se diferencian estructural y funcionalmente de los cuerpos apoptóticos y de los exosomas ya que los primeros en contraste con las MP, se producen durante las fases tardías de la apoptosis, son de mayor tamaño (1 a 4 μm) y generalmente son fagocitados sin generar inflamación; sin embargo, cuando se alteran los mecanismos de depuración pueden ser fuente de autoantígenos (Dignat-George y Boulanger, 2011). Por otra parte, el término exosoma se restringe para vesículas más pequeñas, presentan un diámetro menor o igual a 100 nm (0.1 μm) y son liberadas extracelularmente como consecuencia de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. La elucidación de los mecanismos moleculares que subyacen en la generación de éstas microvesículas que circulan en el torrente sanguíneo es crucial para mejorar el entendimiento y la comprensión de su papel en la salud y en la enfermedad (Hugel y col., 2005; Chironi y col., 2009; Morel y col., 2011).

Micropartículas de Origen Endotelial

Las MP endoteliales (EMP, por sus siglas en inglés) son estructuras vesiculares complejas que se desprenden de las células endoteliales activadas o en

apoptosis (Dignat-George y Boulanger, 2011). Estas vesículas no sólo constituyen un marcador emergente de disfunción del endotelio, sino que también se considera que desempeñan un importante papel biológico en la inflamación, en la lesión vascular, angiogénesis y en la trombosis (Chironi y col., 2009). Se menciona que a pesar de que los mecanismos que conducen a su formación “in vivo” son un tanto desconocidos, la liberación de EMP “in vitro” a partir de células en cultivo puede ser causada por determinadas citocinas y estímulos apoptóticos (Chironi y col., 2009).

Estudios recientes indican que EMP son capaces de disminuir la vasodilatación dependiente de NO, aumentar la rigidez arterial, promover la inflamación e iniciar la trombosis por efecto de su membrana rica en fosfatidilserina (PS, del inglés “Phosphatidylserine”) y la coexpresión del factor tisular (TF, por sus siglas en inglés) (Chironi y col., 2009). Las EMP son conocidas por encontrarse elevadas en los síndromes coronarios agudos, en la hipertensión severa con daño orgánico y en la púrpura trombocitopénica trombótica; es decir en condiciones asociadas con la lesión endotelial y estado protrombótico (Amabile y col., 2008). También la liberación de EMP se ha asociado con la disfunción endotelial de pacientes con esclerosis múltiple, anticoagulante lúpico y más recientemente en enfermedad renal en etapa terminal (Chironi y col., 2009).

Características estructurales. Las EMP son el resultado de una gemación en la membrana plasmática de células de endotelio, por lo que acarrean proteínas endoteliales como caderina, molécula de adhesión plaquetaria 1 (PECAM-1, por sus siglas en inglés), VCAM-1, ICAM-1, endoglina, E-selectina, P-selectina o S-endo (Dignat-George y Boulanger, 2011; Morel y col., 2011). La eNOS y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2, por sus siglas en inglés) también se han identificado en las EMP, sin embargo

no hay evidencia al menos reportada de que la eNOS de las EMP sea capaz de generar NO (Leroyer y col., 2009).

E-selectina (CD62E) se expresa en células endoteliales activadas, pero igualmente se puede encontrar en EMP mediante la activación del TNF- α o la privación del factor de crecimiento para inducir apoptosis (Dignat-George y Boulanger, 2011). La identificación del origen endotelial circulante de las MP se basa en el uso de marcadores específicos para su análisis por citometría de flujo, desafortunadamente excepto E-selectina y la caderina de endotelio vascular (VE-cadherina, por su abreviación en inglés), la mayoría de los marcadores de estas MP carecen de expresión exclusiva de endotelio vascular (Morel y col., 2011).

La composición proteica de las EMP depende altamente del estímulo que desencadene su liberación, pero la mayoría de las proteínas identificadas en estas microvesículas proceden de la membrana plasmática, la fracción citosólica, el citoesqueleto o mitocondrias de la célula de origen, desafortunadamente no existe hasta el momento suficiente información sobre la composición proteica y lipídica de las EMP (Dignat-George y Boulanger, 2011). Las MP contienen material nuclear como ADN, ARN, y micro ARN que pueden transferir a sus células diana; en la mayoría de los casos el papel biológico del material nuclear ha quedado por determinar, pero se ha demostrado que el ARNm que se transfiere de manera horizontal de EMP a las células endoteliales promueve la angiogénesis después de la activación de PKB y la expresión eNOS (Dignat-George y Boulanger, 2011; Morel y col., 2011).

Mecanismos de formación. El conocimiento actual de los mecanismos de vesiculación endotelial se deriva principalmente de experimentos en células endoteliales aisladas o cultivadas, que documentan su capacidad para generar MP después de la activación por una variedad de estímulos (Dignat-George y

Boulanger, 2011). El primer informe de la generación de EMP “in vitro”, fue realizado en células endoteliales de la vena umbilical humana bajo un estímulo de TNF- α (Combes y col., 1999). Además de las citocinas inflamatorias, se ha observado que lipopolisacáridos bacterianos (LPS), especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI, por sus siglas en inglés), trombina, camptotecina (fármaco citotóxico con actividad antiproliferativa), proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) y toxinas urémicas, son capaces de inducir también la generación de EMP “in vitro” (Figura 6) (Dignat-George y Boulanger, 2011).

Las MP en general se producen durante la activación celular o la apoptosis temprana mediante la formación de protrusiones en la membrana celular que pueden desprenderse de la célula por escisión de su tallo de unión como producto de la reorganización del citoesqueleto (Grajales y Vásquez, 2012). En la activación celular la reorganización es secundaria a enzimas dependientes de calcio como la calpaína que degrada proteínas estructurales del citoesqueleto, mientras que en la apoptosis las MP se producen por activación de cinasas intracelulares Rho que fosforilan las cadenas ligeras de miosina y permiten el desarrollo de fuerzas de contracción y deslizamiento (Grajales y Vásquez, 2012). El incremento del calcio citosólico en ambos casos altera las enzimas que mantienen la asimetría de la bicapa lipídica (scramblasa, floppasa, flippasa), lo que propicia la exteriorización de fosfolípidos aniónicos principalmente PS en MP (Figura 7) (Chironi y col., 2009; Morel y col., 2011).

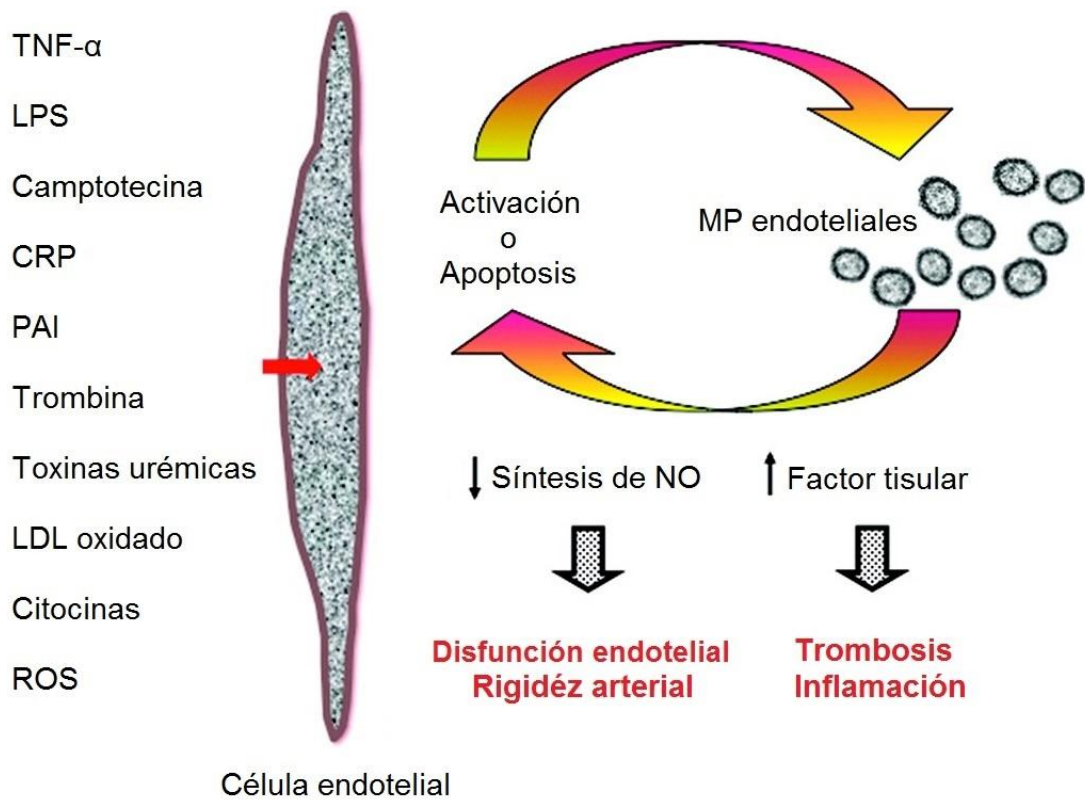


Figura 6. Generación y efectos parácrinos de las micropartículas endoteliales. La activación y/o generación de apoptosis en células endoteliales iniciada por diversos factores como el LPS, LDL oxidado y citocinas proinflamatorias favorece la liberación de micropartículas, disminuye la síntesis de NO y provoca la aparición de disfunción endotelial, trombosis e inflamación. Adaptado de Chironi y col., 2009.

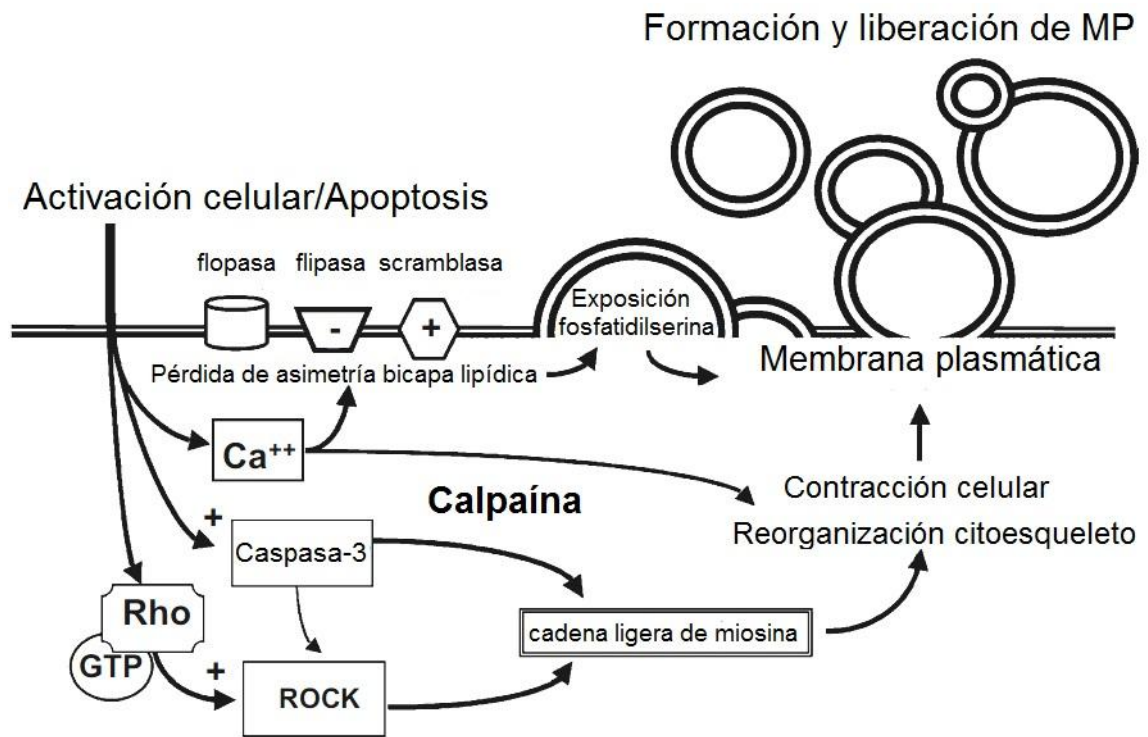


Figura 7. Posibles vías que conducen a la liberación de micropartículas.

El desequilibrio en la asimetría del contenido de la bicapa lipídica permite la exteriorización de fosfatidilserina y las fuerzas de contracción y reorganización en el citoesqueleto promueven la liberación de MP con fosfatidilserina en su membrana extracelular.

(GTP, guanosín trifosfato; ROCK, cinasas Rho)

Adaptado de Chironi y col., 2009.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de Estudio

Descripción

El presente trabajo es un estudio observacional, transversal y analítico llevado a cabo mediante un muestreo de tipo no probabilístico “por conveniencia” para el cual se utilizó como muestra sangre venosa de un grupo de pacientes con DM2 y de un grupo control formado por sujetos sin DM2 aparentemente sanos, pareado en edad.

Selección de Sujetos con DM2

Se incluyeron 14 sujetos diagnosticados con DM2 los cuales respondieron a una invitación abierta hecha a la comunidad para participar en el presente estudio. Los criterios de inclusión establecidos para el muestreo fueron personas con una edad entre 30 y 65 años, residentes de la ciudad de Hermosillo Sonora y diagnosticados con DM2 previamente o al momento de su ingreso al estudio. La valoración clínica y el registro de las variables antropométricas fueron llevados a cabo por un médico especialista colaborador del proyecto apoyado por los resultados proporcionado por el laboratorio y los criterios recomendados por el Comité Internacional de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (American Diabetes Association, 2014). Como criterio de exclusión se tomó en cuenta el paciente que manifestara durante la entrevista haber presentado un proceso de carácter inflamatorio y/o infeccioso en un lapso de ocho semanas previas a la toma de muestra y como no inclusión aquel que decidiera no participar en el proyecto.

Selección de Sujetos Control

Se integró un grupo de 34 personas evaluadas sin DM2 y aparentemente sanas, pareadas en sexo y edad con el grupo de sujetos con DM2 las cuales de la misma forma respondieron a una invitación abierta hecha a la comunidad. El adecuado estado de salud de dichos sujetos también fue valorado clínicamente por un médico especialista colaborador con base en los resultados proporcionados por el laboratorio y los criterios recomendados por el Comité Internacional de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (American Diabetes Association, 2014). Como exclusión o no inclusión fueron utilizados los mismos criterios establecidos en el grupo de sujetos con DM2.

Aspectos Bioéticos

Se emplearon muestras de suero, plasma y sangre total de pacientes con DM2 y sujetos control que se ofrecieron a participar de manera voluntaria a los cuales se les explicó detalladamente el nivel de confidencialidad con el que se manejarán los datos que a través de su participación se aportaron, los posibles riesgos derivados de la extracción de sangre por punción venosa y los alcances y/o beneficios de este proyecto para su persona y para la comunidad. Una vez que los sujetos aceptaron participar en el presente proyecto firmaron una carta de consentimiento informado misma donde se les indicó que en el momento en que decidieran no participar sus datos serían descartados del presente estudio de manera inmediata.

Reactivos

Solución reguladora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) 10 mM (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄); perlas de látex naranja fluorescente con tamaño de partícula de 0.1 µm de diámetro, catálogo L9904 de SIGMA-ALDRICH®; perlas de látex rojo fluorescente con tamaño de partícula de 1.0 µm de diámetro, catálogo L2778 de SIGMA-ALDRICH®; anexina V acoplada a Isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), catálogo 640905 de BioLegend®; buffer de unión para anexina V, catálogo 422201 de BioLegend®; anticuerpo monoclonal anti-humano CD144 (VE-caderina) acoplado a ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés), catálogo 348505 de BioLegend®; control de isotipo IgG2a acoplado a PE, catálogo 400213 de BioLegend®; anticuerpo monoclonal anti-humano CD106 (VCAM-1) acoplado a PE/Cy5, catálogo 305808 de BioLegend®; control de isotipo IgG1 acoplado a PE/Cy5, catálogo 400117 de BioLegend®; anticuerpo policlonal anti-AdipoR1 (M-18) generado en cabra, catálogo sc-46749 de Santa Cruz Biotechnology®; anticuerpo policlonal generado en burro anti-IgG de cabra acoplado a PerCP, catálogo sc-45091 de Santa Cruz Biotechnology®; kit de insulina humana Insulin ELISA, catálogo IS130D de CALBIOTECH®; kit de adiponectina humana/Acrp30 DuoSet, catálogo DY1065 de R&D Systems®; kit de sVCAM-1 humana/CD106 LEGEND MAX™, catálogo 440308 de BioLegend®.

Obtención de Muestras Biológicas

Las muestras sanguíneas de cada paciente fueron obtenidas después de un periodo de ayuno de 12 horas, mediante punción venosa, a través de un sistema de vacío y el uso de agujas de 21 gauges (0.8 x 30 mm) ambos de Vacutainer®. Para cada paciente fueron utilizados en respectivo orden tubos de polipropileno Vacutainer® sin aditivo y tubos de polipropileno Vacutainer® con

EDTA y citrato de sodio como anticoagulante. Posterior al proceso de extracción las muestras obtenidas sin aditivo fueron centrifugadas a 1,500 g durante 10 min para la separación de suero y de igual forma las muestras obtenidas con anticoagulante centrifugadas a 1,500 g durante 15 min para la separación de plasma. Una vez separado el suero y/o plasma éste fue alicuotado (250 µL) y procesado o almacenado a -80° C para su posterior análisis según fuera el caso.

Medidas Antropométricas y Análisis de Laboratorio

Se determinó el peso (masa) de los participantes mediante el uso de una balanza electrónica Defender™ serie 3000 de OHAUS® y la altura medida al milímetro más cercano mediante el uso de un estadiómetro de pared de Holtain Ltd®. El índice de masa corporal (IMC, por sus siglas) fue calculado de la división del peso en kilogramos entre la altura en metros cuadrados (Kg/m^2). Se llevó a cabo para cada participante la determinación de una citometría hemática completa en sangre total mediante el uso de cámara de Neubauer y recuento diferencial de células, se midió la concentración de glucosa, colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, colesterol-LDL, ácido úrico, urea, creatinina (mg/dL) y proteínas totales (g/dL) en suero mediante métodos enzimáticos/colorimétricos de RANDOX® y se determinó la concentración de sVCAM-1, adiponectina e insulina en plasma obtenido con EDTA mediante los ensayos ELISA de BioLegend®, R&D Systems® y CALBIOTECH® respectivamente (Fattah y Darwish, 2001; Weigert y col., 2008;). El valor para resistencia a la acción de la insulina fue determinado mediante el Modelo de Evaluación Homeostática de Resistencia a la Insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) y calculado mediante la ecuación $\text{HOMA-IR} = (\text{insulina plasmática en ayuno } [\mu\text{U/mL}] \times \text{glucosa plasmática en ayuno } [\text{mmol/L}]) / 22.5$ (Matthews y col., 1985). El plasma obtenido con citrato de sodio fue utilizado

para la realización de los ensayos por citometría de flujo.

Preparación y Almacenamiento de Plasma Libre de Plaquetas

Las alícuotas que contenían el plasma con citrato de sodio fueron sometidas a una segunda centrifugación a 3,000 g durante 20 min para eliminar residuos celulares presentes en la muestra y obtener un PPP (plasma pobre en plaquetas). Posteriormente para obtener el PFP (plasma libre de plaquetas, por sus siglas en inglés) se prosiguió a centrifugar las muestras por última vez a 15,000 g a una temperatura de 4°C y por un periodo de 20 min con el fin de eliminar las MP plaquetarias las cuales constituyen el 80% o más de las MP totales. Una vez obtenido el PFP libre de MP plaquetarias que a su vez contiene las MP de interés (EMP), éste fue alicuotado (250 µL) y procesado o inmediatamente almacenado a -80°C para sus futuras determinaciones.

Determinación de Micropartículas y Marcaje de Antígenos de Superficie Para el Análisis por Citometría de Flujo

El área para el análisis y la captura de las MP fue establecida mediante el uso de un sistema de perlas de látex fluorescentes con un diámetro de 0.1 y 1.0 µm (naranja y rojo fluorescente respectivamente) de SIGMA-ALDRICH®. Se utilizaron 2 µL de cada vial de perlas (dilución 1 a 200) en un volumen final de 300 µL de PBS (1 a 30,000) y fueron capturados 50,000 eventos en velocidad baja en el citómetro de flujo FACSCalibur™ de BD y analizados con el programa Summit Software Informer® versión 4.3 de Dako® (Figura 8).

Los ensayos de tinción se realizaron con 25 µL de PFP en tubos para citómetro. Para el análisis de las MP anexina V positivas con tamaño de diámetro entre 0.1 y 1.0 µm se utilizó 1 µL de anexina V acoplada a FITC y

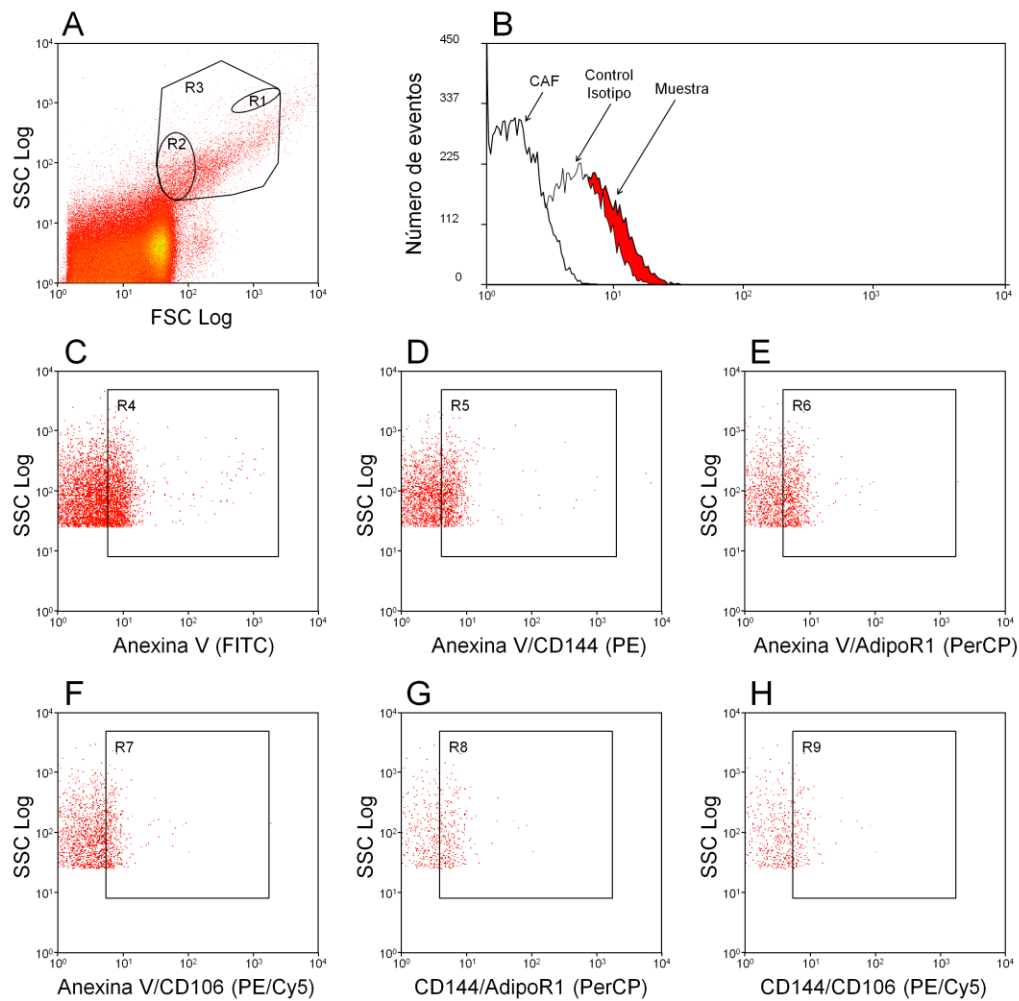


Figura 8. Protocolo de análisis de MP por citometría de flujo.

A) Sistema de perlas para calibración por tamaño “R1” y “R2” y selección de la región de análisis de MP “R3”; B) Controles negativos (autofluorescencia e isotipo); C) Selección de “R4” para expresión de anexina V en MP obtenidas de “R3”; D) Selección de “R5” para MP anexina V/CD144+ (EMP) obtenidas de “R4”; E) Selección de “R6” para MP anexina V/AdipoR1+ obtenidas de “R4”; F) Selección de “R7” para MP anexina V/CD106+ obtenidas de “R4”; G) Selección de “R8” para EMP AdipoR1+ (anexina V/CD144/AdipoR1+) obtenidas de “R5”; H) Selección de “R9” para EMP CD106+ (anexina V/CD144/CD106+) obtenidas de “R5”.

100 μ L de buffer de unión para anexina V, para las EMP se utilizaron 2 μ L de anticuerpo monoclonal anti-humano CD144 (VE-caderina) acoplado a PE. En el caso del receptor AdipoR1 presente en MP fueron empleados 1 μ L de anticuerpo primario policlonal anti-AdipoR1 generado en cabra y 1 μ L de anticuerpo secundario policlonal generado en burro anti-IgG de cabra acoplado a PerCP y para la molécula de adhesión VCAM-1 presente en MP se utilizó 1 μ L de anticuerpo monoclonal anti-humano CD106 (VCAM-1) acoplado a PE/Cy5 (ver Figura 8).

El tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de 30 min y del secundario y monoclonales entre 30 y 40 min en oscuridad. En cada ensayo el PFP fue bloqueado previamente durante 30 min con 2.5 μ L de inmunoglobulinas humanas de CSL Behring[®] y todos los tubos fueron llevados hasta un volumen final de 300 μ L con PBS, se analizaron 20,000 eventos próximos a la región establecida de MP mediante el uso del citómetro FACSCalibur[®] de BD[®] en velocidad de flujo baja y los datos obtenidos fueron analizados en el programa Summit Software Informer[®] (ver Figura 8).

Análisis Estadístico

Se compararon los parámetros clínicos y de laboratorio de ambos grupos de estudio mediante la prueba t de Student para muestras independientes cuando los resultados obtenidos tuvieron una distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes cuando los datos obtenidos tuvieron una distribución no paramétrica. Se evaluaron las asociaciones del análisis bioquímico mediante la prueba de correlación de Pearson y se llevó a cabo un análisis de regresión lineal en ambos grupos de estudio. Para explicar la relación de sVCAM-1 con las variables predictoras, el mejor modelo de ajuste incluyó la concentración de adiponectina en plasma, el receptor AdipoR1 en MP totales, el valor de HOMA-IR, el IMC y el uso de fármacos para el tratamiento

de la hipertensión en específico los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA, por sus siglas) y los bloqueadores de los receptores de angiotensina (BRA, por sus siglas). Así mismo se desarrolló otro análisis de regresión lineal para explicar la relación del valor de HOMA-IR como variable dependiente y a la adiponectina, AdipoR1 en MP totales, IMC y tratamiento con IECA/BRA como variables predictoras. Para el análisis de correlación de Pearson y regresión lineal todos los parámetros con distribuciones no paramétricas fueron transformados con la función de logaritmo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS Statistics versión 21.0 de IBM® para Windows y en todos los casos fue considerado un valor de significancia de P menor a 0.05 equivalente al 95% de confianza. Todos los ensayos y determinaciones fueron llevados a cabo por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conformación de Grupos

La población de estudio consistió en 48 sujetos que respondieron a una invitación abierta realizada a la comunidad los cuales fueron sometidos a una evaluación clínica completa por un médico colaborador especialista en el área para la conformación de grupos. De los 48 participantes seleccionados para el proyecto 14 fueron incluidos en el grupo de pacientes con DM2 y los 34 restantes incluidos en el grupo control.

Comparación de los Parámetros Clínicos y de Laboratorio Entre el Grupo de Sujetos con DM2 y Grupo Control

Se llevó a cabo la comparación entre grupos de los parámetros clínicos y pruebas de laboratorio desarrolladas en la cual el grupo de sujetos con DM2 presentó diferencias significativas en comparación al grupo control en las determinaciones de glucosa, insulina, HOMA-IR, adiponectina y sVCAM-1 (Tabla II). Las variables sVCAM-1, glucosa, insulina y HOMA-IR resultaron aumentadas significativamente en el grupo de sujetos con DM2 con valores de 486.5 ng/mL ($P = 0.034$), 6.4 mmol/L ($P = 0.0001$), 5.8 μ U/mL ($P = 0.001$) y 1.80 ($P = 0.0001$) respectivamente, mientras que la adiponectina resultó disminuida con un valor de 5.3 μ g/mL ($P = 0.0001$) en comparación al grupo control.

Los resultados anteriores concuerdan con trabajos previamente reportados por otros autores en los cuales se establece una disminución de la concentración de adiponectina total en plasma en enfermedad cardiovascular y algunos trastornos metabólicos como la obesidad, estados inflamatorios, resistencia a la insulina y DM2 (Altinova y col., 2007; Cusi y Ocampo, 2011; Qu

Tabla II. Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio.

Parámetro	DM2 (n = 14)	Control (n = 34)
Edad (años)	53.78 ± 15.22	54 ± 12.29
Sexo		
Masculino (50%)	8 (57.14%)	16 (47.05%)
Femenino (50%)	6 (42.86%)	18 (52.95%)
IMC (Kg/m ²)	33.92 ± 12.74	29.52 ± 4.14
Tensión arterial ≥140/90 (mm Hg)	3 (21.42%)	6 (17.64%)
Glucosa en ayuno (mmol/L)	6.4 (8.5-5.8) ^a	4.9 (5.2-4.4)
Insulina en ayuno (μU/mL)	5.8 (14.2-4.5) ^a	3.9 (4.8-2.7)
HOMA-IR	1.80 (4.2-1.2) ^a	0.83 (1.1-0.5)
Colesterol total (mg/dL)	225 (315.2-160.7)	204.5 (230-177.7)
Triglicéridos (mg/dL)	136.5 (182.5-100.2)	126.5 (164.5-86.5)
Colesterol-LDL (mg/dL)	132.5 (191.4-92.5)	134 (147.4-102.7)
Colesterol-HDL (mg/dL)	40.5 (54.7-32.5)	46 (56.2-37.5)
Adiponectina (μg/mL)	5.3 (7-3.5) ^a	10.6 (15-9.5)
sVCAM-1 (ng/mL)	486.5 (527.3-383.3) ^b	389.5 (478-324.8)
Uso de TZD	1 (7.14%)	0 (0%)
Uso de Fibratos/Estatinas	3 (21.42%)	1 (2.94%)
Uso de IECA/BAR	2 (14.28%)	5 (14.70%)

Los resultados son expresados en medias ± desviación estándar, medianas (rango intercuartil) o porcentaje.

^a $P < 0.01$.

^b $0.01 < P < 0.05$.

(TZD, tiazolidinedionas; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II; BRA, bloqueadores de los receptores de angiotensina II).

y col., 2011; Al-Hamodi y col., 2014). La mayoría de estos estudios muestran que el nivel de adiponectina en la DM2 se encuentra disminuido desde la etapa inicial de esta condición, de hecho una gama de estudios prospectivos ha demostrado que niveles circulantes altos de adiponectina se asocian con bajo riesgo de DM2, incluso después de ajustar por múltiples factores que podrían confundir esta relación (Lindsay y col., 2002; Sharma y col., 2008; Miazgowski y col., 2014).

Por otra parte se conoce que las moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 se encuentran sobre expresadas cuando se compromete la actividad de la enzima eNOS y la producción de NO como es el caso de la disfunción endotelial que suele presentarse en la DM2 (Milosz y col., 2007). Al igual que en los resultados obtenidos en el presente trabajo se ha observado que la molécula de sVCAM-1 que al parecer surge por desprendimiento o rotura proteolítica de las células endoteliales, se encuentra en mayor concentración en sujetos con DM2 que tienen un cierto grado de disfunción endotelial (Milosz y col., 2007). Esta condición es ocasionada principalmente por el estado de resistencia a la insulina típico de la DM2 en donde se genera una disminución selectiva de la vía de PI3K pero no de la vía MAPK (Cusi y col., 2000; Roberts y Porter, 2013).

La resistencia a la insulina y la disminución selectiva de PI3K provoca una disminución de la actividad de eNOS y un aumento en la expresión de genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α que ocasiona la sobre expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 en el endotelio vascular, el reclutamiento de macrófagos y la generación de células espumosas (Cusi y col., 2000), además de que se reduce la captación de glucosa lo que genera un estado de hiperinsulinemia que favorece la aparición de un fenómeno proaterogénico con deficiente producción de NO (Cusi y col., 2000).

También se llevó a cabo una comparación entre ambos grupos de estudio del número de MP expresado en porcentaje en la cual se evidenció una diferencia significativa en todos los marcadores de fenotipo utilizados a excepción de MP CD144/AdipoR1+ (receptor en EMP), es decir en MP anexina V (MP totales), MP CD144 (EMP), MP AdipoR1 (receptor en MP totales), MP CD106 (VCAM-1 en MP totales) y MP CD144/CD106 (VCAM-1 en EMP). Mientras que los porcentajes de las MP anexina V+, MP CD144+, MP CD106+ y MP CD144/CD106+ se mostraron significativamente aumentados en el grupo de sujetos con DM2 ($P = 0.001$, 0.013 , 0.003 , 0.003 , respectivamente), el porcentaje de MP AdipoR1+ resultó disminuido significativamente en comparación al grupo control ($P = 0.013$) (Figura 9).

Estos resultados coinciden con otros trabajos en donde se ha reportado un incremento tanto en el número de MP totales como el de EMP (CD144) en pacientes con DM2, mismos que sugieren a las EMP como un posible marcador de diabetes asociado con disfunción endotelial (Sabatier y col., 2002; Tramontano y col., 2010). Estos estudios han analizado a las EMP con técnicas de microscopía y citometría de flujo con fenotipos como CD31+ (PECAM-1), CD105+ (endoglina) y CD106 (VCAM-1) los cuales fueron significativamente superiores en los pacientes con DM2 en comparación con el grupo control de sujetos no diabéticos (Koga y col., 2005). El fenotipo mostrado de las EMP en los sujetos con DM2 de estos trabajos sugiere a un mecanismo apoptótico como productor de EMP debido a que CD31 es una molécula relacionada con la angiogénesis, la función plaquetaria y la trombosis, CD105 una molécula que se encuentra en la mayoría de los microvasos de las placas de ateroma y CD106 una molécula involucrada en la inflamación y la progresión de las placas ateroscleróticas (Jiménez y col., 2003; Tramontano y col., 2010).

De la misma forma en que se buscaron diferencias entre ambos grupos en el porcentaje de MP, se examinaron posibles diferencias en la intensidad de fluorescencia registrada por el equipo y software de citometría de flujo de cada

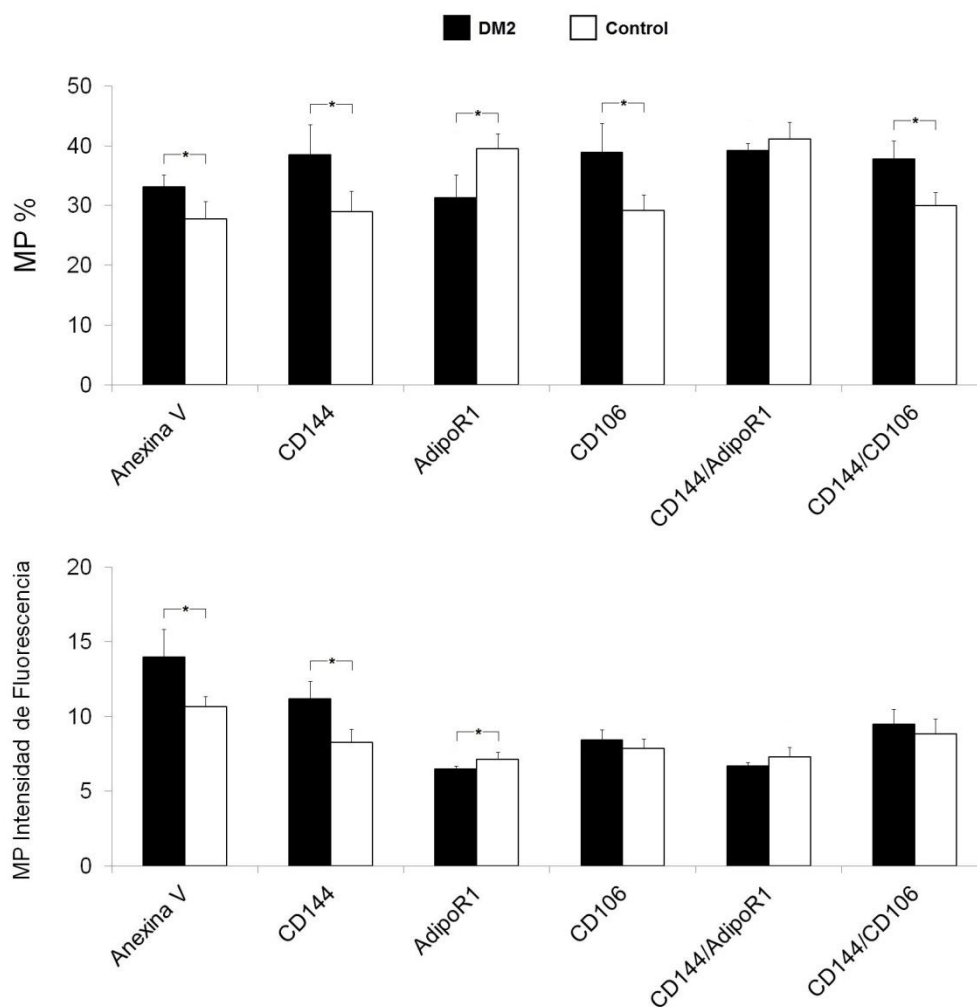


Figura 9. Diferencia de MP e intensidad de fluorescencia entre el grupo de sujetos con DM2 y grupo control.

Las barras representan las medias de cada variable medida por citometría de flujo; las barras negras representan las medias del grupo de sujetos con DM2 y las barras blancas al grupo control. Los ejes verticales presentan al número de MP expresado en porcentaje y la intensidad de fluorescencia de cada marcador utilizado respectivamente. Las diferencias significativas entre grupos se indican sobre las barras. Todos los parámetros con distribuciones no paramétricas fueron transformados con la función de logaritmo para la prueba estadística.

* $P < 0.05$.

marcador de fenotipo utilizado en las muestras de los dos grupos de estudio. Los resultados mostraron diferencias significativas de la intensidad de fluorescencia cuando se leyó anexina V, CD144 y al receptor AdipoR1 en MP (ver Figura 9). Mientras que la intensidad de fluorescencia de anexina V y CD144 se mostraron mayores en el grupo de sujetos con DM2 ($P = 0.043$ y 0.037 , respectivamente), la intensidad de fluorescencia del receptor AdipoR1 en MP se mostró disminuida en comparación al grupo control ($P = 0.003$) (ver Figura 9).

A pesar de la relación de los resultados obtenidos con estudios previos sobre MP totales, EMP y VCAM-1 en EMP, en la actualidad no se tienen suficientes reportes que analicen al receptor AdipoR1 a nivel celular para poder comparar los resultados obtenidos respecto a la expresión de AdipoR1 tanto en MP totales como en EMP, de los cuales sólo AdipoR1 en MP totales se observó disminuido significativamente en comparación con el grupo control tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia (ver Figura 9). A pesar de la escasez de los estudios con respecto a este receptor, los resultados expuestos en este trabajo permiten asumir que el receptor AdipoR1 se encuentra disminuido a nivel de superficie celular en la DM2, debido a lo evidenciado a nivel de MP.

Este hallazgo se podría argumentar en que la disminución de la concentración de adiponectina total en plasma por causa de la hipertrofia del tejido adiposo en los pacientes con DM2 se asocia con resistencia a la insulina y por lo tanto con un estado de hiperinsulinemia (Kadowaki y Yamauchi, 2005). Se ha estudiado que resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia afectan la expresión de los receptores AdipoR1 y AdipoR2 a nivel de superficie celular, lo que provoca un estado de resistencia a la adiponectina y por lo tanto la disminución de sus efectos (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Yamauchi y col., 2007).

Los resultados obtenidos también mostraron elevado el número (porcentaje) de EMP, la concentración de la molécula de VCAM-1 en su forma soluble y el porcentaje de MP CD144/CD106 en los pacientes con DM2 en comparación al grupo de sujetos sin DM2, lo que hace suponer que determinantes como la resistencia a la insulina o el desequilibrio en el plasma lipídico afectan el adecuado funcionamiento del endotelio vascular (Koga y col., 2005; Chironi y col., 2009; Tramontano y col., 2010).

Evaluación de las Asociaciones del Análisis Bioquímico

Se analizaron asociaciones mediante la prueba de correlación de Pearson por grupo (sujetos con DM2 y grupo control) de las variables medidas del análisis bioquímico seleccionado (Tabla III) de las cuales se encontró una asociación negativa entre las variables de sVCAM-1 y adiponectina en plasma en grupo control, la asociación encontrada mostró un coeficiente de correlación de -0.561 ($P = 0.001$), misma que no se observó en el grupo de sujetos con DM2 la cual registró un coeficiente de correlación de -0.364 sin alcanzar valor de significancia estadística ($P = 0.200$) (Figura 10).

Con base a estos resultados se argumenta que el empleo de un número de muestra mayor para el estudio de un grupo de pacientes con DM2 podría ofrecer la posibilidad de encontrar la asociación observada en el grupo control de la concentración de adiponectina y sVCAM-1. Es importante mencionar que las concentraciones de ambas variables en el grupo de pacientes con DM2 se mostraron con bastante heterogeneidad, lo que hace suponer que en el estado dismetabólico de la DM2, el cual es muy particular entre cada paciente debido al tiempo y evolución de la enfermedad, la amplia gama de factores involucrados que se encuentran alterados podrían afectar la asociación que en condiciones aparentemente sanas y sin la presencia de DM2 se logró observar

Tabla III. Correlaciones de Pearson del análisis bioquímico en grupo de sujetos con DM2 y grupo control.

	Adiponectina (r)	sVCAM-1 (r)	HOMA-IR (r)	MP CD144 (r)	MP AdipoR1 (r)	MP CD106 (r)	MP CD144/AdipoR1 (r)	MP CD144/CD106 (r)	Control
Adiponectina		-0.561 ^a	-0.388 ^b	-0.336	0.194	-0.531 ^a	0.219	-0.449 ^a	
SVCAM-1	-0.364		0.496 ^a	0.310 ^b	-0.370 ^b	0.409 ^b	-0.441 ^a	0.187	
HOMA-IR	-0.605 ^b	0.737 ^a		0.157	-0.535 ^a	0.205	-0.305	0.191	
MP CD144	-0.105	0.548 ^b	0.501		-0.180	0.781 ^a	0.218	0.841 ^a	
MP AdipoR1	0.637 ^b	-0.726 ^a	-0.881 ^a	-0.503		-0.266	0.275	-0.231	
MP CD106	0.005	0.543 ^b	0.436	0.967 ^a	-0.420		-0.051	0.737 ^a	
MP CD144/AdipoR1	0.103	-0.780 ^a	-0.395	-0.500	0.415	-0.564 ^b		-0.045	
MP CD144/CD106	-0.064	0.157	0.162	0.700 ^a	-0.023	0.732 ^a	-0.104		
DM2									

Todos los parámetros con distribuciones no paramétricas fueron transformados con la función de logaritmo para la prueba estadística.

^a P < 0.01.

^b 0.01 < P < 0.05.

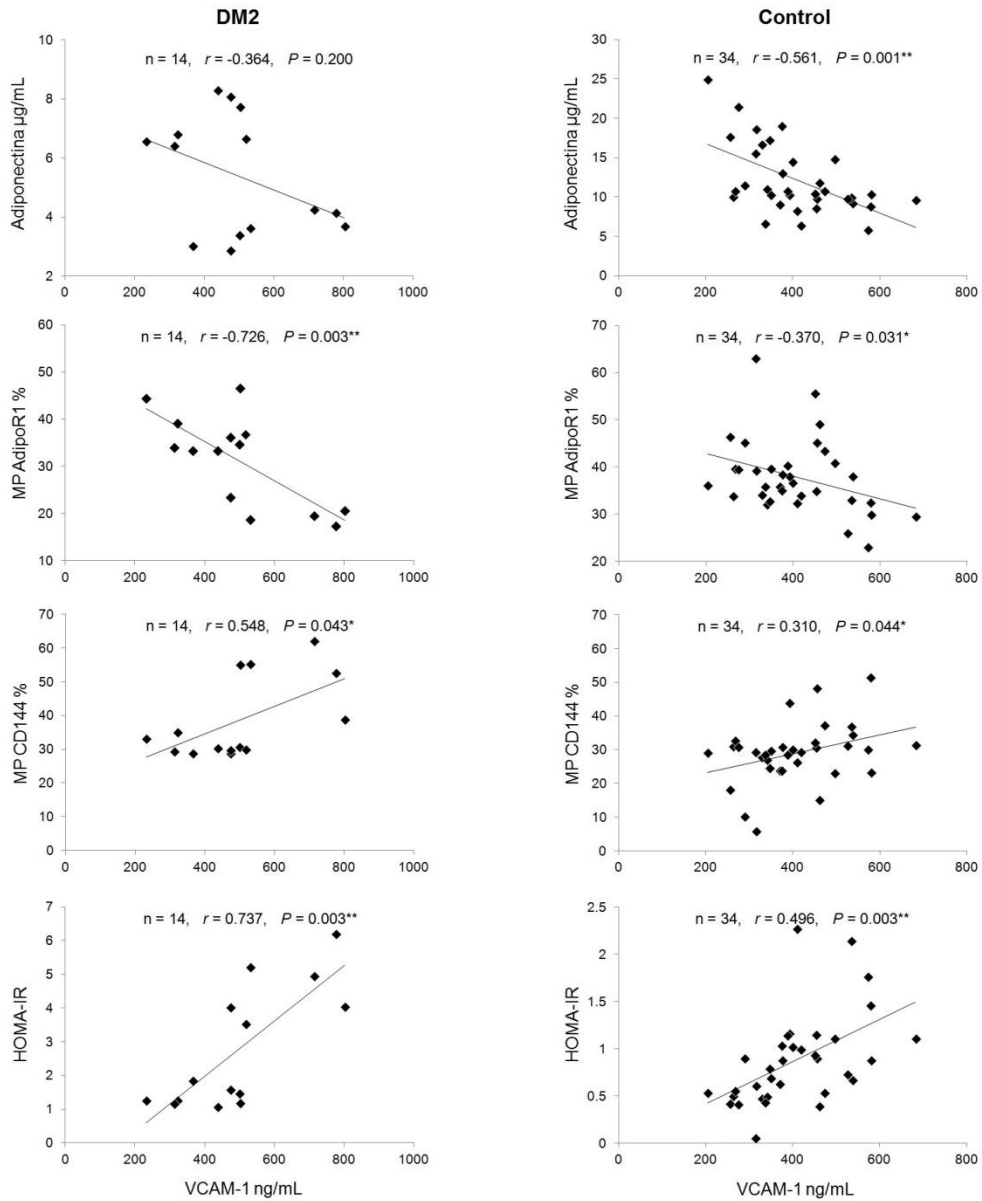


Figura 10. Correlaciones de Pearson de sVCAM-1 por grupo.

El eje horizontal representa los niveles de molécula de sVCAM-1 y los ejes verticales adiponectina, MP AdipoR1, MP CD144 y HOMA-IR, descendientemente. La columna izquierda presenta las correlaciones del grupo de sujetos con DM2 y la columna derecha las del grupo control. Todos los parámetros con distribuciones no paramétricas fueron transformados con la función de logaritmo para la prueba estadística.

Por lo tanto, mediante el estudio de un grupo que incluya un mayor número de pacientes con DM2, y que además, se presente con complicaciones vasculares, se podría comprobar si permanece la nula asociación o si resulta como en el grupo control.

Además, se buscaron asociaciones entre sVCAM-1 y el valor de HOMA-IR las cuales mostraron una asociación positiva en ambos grupos, mientras que en el grupo control se observó un coeficiente de correlación de 0.496 ($P = 0.003$), en el grupo de sujetos con DM2 se registró un valor de correlación de 0.737 ($P = 0.003$) (ver Figura 10). Esta asociación, puede ser debido a que la resistencia a la insulina afecta al endotelio vascular principalmente por la aparición de la dislipidemia aterogénica, que involucra un aumento en el colesterol-LDL y moléculas LDL oxidadas y la generación de AGES, que se unen a sus receptores en células endoteliales, aumenta el factor tisular y la expresión de moléculas de adhesión y afectan a la trombosulina y la producción de NO (Cusi y col., 2000; Sánchez-Recalde y Kaski, 2001; Díaz y col., 2004).

Estos resultados concuerdan con estudios previos los cuales para investigar la relación entre la inflamación y la activación endotelial con resistencia a la insulina y la adiposidad en la DM2, se buscaron asociaciones entre resistencia a la insulina medida por el modelo HOMA-IR y marcadores de inflamación endotelial como VCAM-1, ICAM-1, PCR de alta sensibilidad o IL-6 en donde HOMA-IR correlacionó significativamente con todas las medidas de adiposidad y los marcadores de inflamación y disfunción endotelial. Por lo que hace suponer que la activación endotelial y la inflamación de fase aguda correlaciona con la resistencia a la insulina y la obesidad en pacientes con DM2 (Leinonen y col., 2003). Además, existe evidencia de que la adiponectina ya sea en su longitud completa o la fracción globular estimula la producción de NO y la vasodilatación, así como también estimula la vía de señalización p38 MAPK en células endoteliales aórticas de humano (Addabbo y col., 2011).

Asimismo se analizó la posible correlación entre sVCAM-1 y MP, por ejemplo se estudió la asociación entre sVCAM-1 y MP AdipoR1+ la cual se observó con una pendiente negativa en ambos grupos de estudio. Mientras que en el grupo control se obtuvo un coeficiente de correlación de -0.370 ($P = 0.031$), en el grupo de pacientes con DM2 un coeficiente de -0.726 ($P = 0.003$). También se analizó la posible asociación entre sVCAM-1 y el porcentaje de MP CD144+, es decir EMP; en esta ocasión igualmente se encontró correlación en los dos grupos de estudio pero de carácter positiva, mientras que en el grupo control se obtuvo un coeficiente de 0.310 ($P = 0.044$), en el grupo de pacientes con DM2 se observó un coeficiente de correlación de 0.548 ($P = 0.043$).

Son pocos los estudios que se reportan sobre EMP asociadas directamente con la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 como marcador de daño endotelial en la DM2. Se ha encontrado una asociación positiva en pacientes con DM2 de EMP (MP CD144+) con IL-1, la cual es una citocina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por macrófagos activados y se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés (Tramontano y col., 2010). Sin embargo no existen estudios consensados que involucren al receptor AdipoR1 en MP endoteliales en la DM2 o resistencia a la insulina y que sean utilizados para contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Existe controversia en cuanto a la adiponectina y sus receptores puesto que algunos estudios han reportado que esta adipocina en su forma globular y en unión a su receptor AdipoR1 se asocia con un aumento en la actividad del NF- κ B y la activación del endotelio vascular como resultado de la estimulación de la vía p38 MAPK (Addabbo y col., 2011), sin embargo no es el caso para la adiponectina en su isoforma completa, también conocida como adiponectina de alto peso molecular la cual muestra actividad de carácter antiinflamatorio (Tomizawa y col., 2008). Se discute que esta situación es posible sobre todo si existen condiciones que propicien la sobreexpresión de moléculas de adhesión

por encima de la vasodilatación y producción de óxido nítrico que favorece la adiponectina, como por ejemplo la presencia de un estado de resistencia a la insulina con un predominio de la activación de la vía MAPK sobre la vía PI3K (Roberts y Porter, 2013).

Análisis de los Modelos de Regresión Lineal de sVCAM-1 y HOMA-IR

Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal en los dos grupos de estudio para explicar la variación de sVCAM-1 con la concentración de adiponectina en plasma, AdipoR1 en MP totales, el valor de HOMA-IR, el IMC y el uso de fármacos antihipertensivos IECA y/o BRA como variables predictoras (Tabla IV). Se incluye en el modelo el valor de HOMA-IR como variable predictora porque la resistencia a la insulina afecta al endotelio vascular principalmente por su asociación con la aparición de dislipidemia, la generación de AGES y la disminución en la producción de NO, lo que resulta en un efecto procoagulante y proaterogénico para las células endoteliales debido a la expresión de moléculas de adhesión y la interacción con células mononucleares y macromoléculas glicooxidadas (Cusi y col., 2000; Sánchez-Recalde y Kaski, 2001; Díaz y col., 2004).

La inclusión del IMC en el modelo corresponde a que un IMC aumentado (≥ 30) también se asocia con determinantes como la aparición de resistencia a la insulina y dislipidemia (López-Jiménez y Cortés-Bergoderi, 2011). Por otra parte, el uso de fármacos antihipertensivos IECA y BRA se incluye en el modelo debido que ambos, aunque con diferente mecanismo inhiben las funciones de la angiotensina II y en consecuencia los efectos hormonales que produce como vasoconstricción, facilitación simpática, estimulación de secreción de aldosterona, vasopresina, TNF y radicales libres, retención de sodio o agua, así como estimulación del crecimiento celular y de la matriz extracelular (Lopera y col., 2001).

Tabla IV. Análisis de regresión lineal para explicar la variación en sVCAM-1.

Modelo	Control									
	DM2		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	
	B	Error típ	Beta	t	P	B	Error típ	Beta	t	P
(Constante)	6.688	2.171		3.080	0.015	5.269	1.081		4.876	0.0001
Adiponectina	-0.212	0.202	-0.234	-1.049	0.325	-0.350	0.123	-0.428	-2.842	0.008
MP AdipoR1	-0.523	0.426	-0.497	-1.229	0.254	-0.426	0.268	-0.260	-1.589	0.123
HOMA-IR	0.140	0.198	0.263	0.707	0.500	0.194	0.073	0.463	2.648	0.013
IMC	0.013	0.269	0.012	0.048	0.963	0.002	0.027	0.009	0.064	0.949
IECA/BRA	-0.445	0.207	-0.458	-2.151	0.064	-0.078	0.111	-0.703	-0.703	0.488

Ajuste múltiple DM2: R2 = 0.629; ANOVA F = 5.415, P = 0.018. Control: R2 = 0.369; ANOVA F = 4.856, P = 0.003. Todos los parámetros con distribuciones no paramétricas fueron transformados con la función de logaritmo para la prueba estadística.

Los resultados del modelo mostraron la dependencia de sVCAM-1 ante un cambio en la concentración de adiponectina total en plasma y el valor de HOMA-IR (solamente en grupo control), mientras que la adiponectina mostró una asociación negativa con un valor de beta de -0.428 ($P = 0.008$), HOMA-IR exhibió una asociación positiva con un valor de beta de 0.463 ($P = 0.013$). Si bien, las pruebas de correlación permitieron establecer asociaciones entre variables como adiponectina, HOMA-IR y MP AdipoR1+ en ambos grupos a excepción de la adiponectina, que se observó sólo en grupo control, el análisis de regresión no mostró la dependencia de sVCAM-1 asociada a los niveles de MP AdipoR1+ en ambos grupos. Estos resultados hacen suponer que en condiciones aparentemente sanas y sin la presencia de DM, la variación de sVCAM-1 no está influenciada por un cambio en MP AdipoR1+, pero sí por la adiponectina o el valor de HOMA-IR.

Al igual que en la prueba de Pearson en donde no se encontró una asociación entre adiponectina y sVCAM-1 en el grupo de pacientes con DM2, no se observó alguna dependencia de sVCAM-1 con las variables predictoras incluidas en el modelo de regresión en este grupo. Nuevamente se podría atribuir al número disminuido de muestra logrado para la conformación del grupo como un impedimento para que se observaran los resultados como los mostrados en el grupo control. Sin embargo, es importante tomar en cuenta al igual que en el caso anterior, el estado dismetabólico de este padecimiento, su evolución y la amplia lista de factores que se encuentran alterados en este grupo de trastornos metabólicos llamado DM2 (Alberti y col., 2007; Cusi y Ocampo, 2011; Mercurio y col., 2012; Al-Hamodi y col., 2014).

Finalmente para estudiar la variación de las asociaciones mostradas en la prueba de Pearson pero para HOMA-IR, se llevó a cabo otro modelo de regresión lineal el cual lo incluyó como variable dependiente y a la adiponectina total en plasma, AdipoR1 en MP totales, el IMC y el uso de fármacos IECA y/o BRA como variables de ajuste (Tabla V). Para el modelo con HOMA-IR, el uso

Tabla V. Análisis de regresión lineal para explicar la variación en HOMA-IR.

Modelo	Control									
	DM2					Control				
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		t	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		t
B	Error típ	Beta	Error típ	B		Error típ	Beta	Error típ		
(Constante)	4.957	3.251			1.525	0.162	8.823	2.187	4.035	0.0001
Adiponectina	-0.119	0.338	-0.170		-0.351	0.033	-0.580	0.292	-1.981	0.047
MP AdipoR1	-1.468	0.421	-0.744		-2.817	0.020	-1.849	0.485	-3.160	0.004
IMC	0.155	0.450	0.074		0.344	0.739	0.030	0.067	0.453	0.654
IECA/BRA	-0.265	0.336	-0.146		-0.790	0.450	-0.007	0.281	-0.026	0.979

Ajuste múltiple DM2: $R^2 = 0.702$; ANOVA $F = 8.660$, $P = 0.004$. Control: $R^2 = 0.288$; ANOVA $F = 4.343$, $P = 0.007$. Todos los parámetros con distribuciones no paramétricas fueron transformados con la función de logaritmo para la prueba estadística.

del IMC como variable predictora se justifica en que la obesidad se asocia con la presencia de resistencia a la insulina, y en el caso de los fármacos IECA y BRA porque se ha observado que la administración de ambos en el organismo alteran los niveles de adiponectina resultando en un aumento de su concentración basal (Cusi y col., 2000; Al-Hamodi y col., 2014).

En esta ocasión los resultados del modelo mostraron la dependencia del valor de HOMA-IR con la concentración de adiponectina y el receptor AdipoR1 en MP en los dos grupos de estudio (ver Tabla V). En el grupo control se observó un valor de beta para adiponectina de -0.297 ($P = 0.047$) y para AdipoR1 un valor de -0.474 ($P = 0.004$), mientras que en el grupo de sujetos con DM2 -0.170 ($P = 0.033$) para adiponectina y -0.744 ($P = 0.020$) para AdipoR1, respectivamente. Lo que permite asumir que si existe variación en HOMA-IR respecto a un cambio de adiponectina o el receptor AdipoR1 estudiado en MP plasmáticas. Esta asunción se apoya en los antecedentes de que tanto la adiponectina como su receptor AdipoR1 activan vías de señalización intracelulares que convergen en promover un aumento de la sensibilidad a la insulina ya sea mediante la translocación de GLUT 4 a la superficie celular o la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos.

Con base en los resultados anteriormente descritos, los modelos de regresión lineal para HOMA-IR en ambos grupos y para sVCAM-1 en grupo control concuerdan con las asociaciones mostradas en las pruebas de correlación de Pearson, y además, coinciden con estudios previamente reportados por otros autores los cuales han observado asociaciones entre la elevación de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión con disfunción endotelial y resistencia a la insulina en la DM2 (Leinonen y col., 2003; Altinova y col., 2007; Al-Hamodi y col., 2014).

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la evaluación de un análisis bioquímico en muestras sanguíneas de pacientes con DM2 y sujetos control el cual incluyó la determinación en plasma de adiponectina y sVCAM-1, el cálculo de HOMA-IR como estimador de resistencia a la insulina y el análisis por citometría de flujo de MP con el fenotipo de anexina V, CD144, CD106 y el receptor AdipoR1.

La determinación de sVCAM-1 y HOMA-IR fue significativamente mayor en el grupo de sujetos con DM2, mientras que la adiponectina resultó disminuida en comparación al grupo control. El porcentaje de MP que expresaron al fenotipo anexina V, CD144, CD106 y CD144/CD106 fue significativamente mayor en el grupo de sujetos con DM2, mientras que el porcentaje de MP que expresaron AdipoR1 fue mayor en el grupo control. Las intensidades de fluorescencia entre ambos grupos se observaron diferentes significativamente sólo en las MP con el fenotipo de expresión de anexina V, CD144 y AdipoR1.

El análisis de las asociaciones evidenció en ambos grupos una correlación positiva de la concentración de sVCAM-1 con el valor de HOMA-IR y el porcentaje de EMP, mientras que reveló una asociación negativa de la concentración de sVCAM-1 con la adiponectina (sólo en grupo control) y el porcentaje de MP con el receptor AdipoR1. El modelo de análisis de regresión lineal empleado para HOMA-IR reflejó en los dos grupos estudiados la permanencia de las asociaciones con la adiponectina y el receptor AdipoR1 presente en MP, en tanto que el modelo empleado para sVCAM-1 evidenció la permanencia de las asociaciones con la adiponectina y HOMA-IR pero solamente en grupo control.

No se encontró asociación entre adiponectina y sVCAM-1 mediante la prueba de correlación de Pearson ni tampoco dependencia de sVCAM-1 con adiponectina, MP AdipoR1+ y HOMA-IR en el grupo de pacientes con DM2.

Estos resultados podrían atribuirse al número disminuido de muestra logrado para la conformación del grupo como un impedimento para evidenciar la asociación o dependencia. Sin embargo, es importante señalar la heterogeneidad resultante de las concentraciones de ambas variables en el grupo de pacientes con DM2, circunstancia que a la vez, se atribuye al estado dismetabólico y a la evolución de la enfermedad. Para evidenciar si permanece la nula asociación o por el contrario reflejar alguna correlación como la mostrada en el grupo control, se recomendaría llevar a cabo un estudio similar el cual incluya un mayor número de pacientes diagnosticados con DM2 y complicaciones vasculares.

Las diferencias en los porcentajes y las intensidades de fluorescencia de los distintos fenotipos utilizados en MP, las asociaciones de EMP, AdipoR1 en MP y HOMA-IR con sVCAM-1 y los análisis de regresión lineal para sVCAM-1 (grupo control) y HOMA-IR en ambos grupos, concuerdan con estudios prospectivos los cuales han reportado un incremento en el número de MP totales y EMP (CD144+) en pacientes con DM2, mismos que proponen a las EMP como un posible biomarcador de disfunción y/o lesión endotelial debido a que permiten el acceso a un tejido normalmente inaccesible como lo es el endotelio vascular.

A pesar de las escasas publicaciones respecto al estudio del receptor AdipoR1 a nivel de superficie celular, los resultados obtenidos del presente trabajo permiten entender y suponer que la variación de los niveles de la adiponectina y de su receptor AdipoR1, así como consecuentemente la disminución de los efectos antiinflamatorios y citoprotectores del complejo adiponectina-AdipoR1 podría afectar la concentración en plasma de moléculas de adhesión como VCAM-1 (sVCAM-1) y por lo tanto el equilibrio óptimo del funcionamiento del endotelio vascular. La disfunción endotelial es considerada la principal causa del origen de las complicaciones vasculares en la DM2.

REFERENCIAS

- Addabbo F, Nacci C, De Benedictis L, Leo V, Tarquinio M, Quon MJ, Montagnani M. 2011. Globular adiponectin counteracts VCAM-1-mediated monocyte adhesion via AdipoR1/NF-kappaB/COX-2 signaling in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(6):1143-1154.
- Alberti L, Gilardini L, Girola A, Moro M, Cavagnini F, Invitti C. 2007. Adiponectin receptors gene expression in lymphocytes of obese and anorexic patients. *Diabetes Obes Metab* 9(3):344-349.
- Al-Hamodi Z, Al-Habori M, Al-Meerri A, Saif-Ali R. 2014. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 6(1):99.
- Altinova AE, Toruner F, Bukan N, Yasar DG, Akturk M, Cakir N, Arslan M. 2007. Decreased plasma adiponectin is associated with insulin resistance and HDL cholesterol in overweight subjects. *Endocr J* 54(2):221-226.
- Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. 2008. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177(11):1268-1275.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1):79-83.
- American Diabetes Association. 2013. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care* 36 Suppl 1(1):11-66.

- Bazzano LA, Serdula M, Liu S. 2005. Prevention of type 2 diabetes by diet and lifestyle modification. *J Am Coll Nutr* 24(5):310-319.
- Beylot M, Pinteur C, Peroni O. 2006. Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats. *Metabolism* 55(3):396-401.
- Biesiada G, Czepiel J, Sobczyk-Krupiarz I, Salamon D, Garlicki A, Mach T. 2009. Levels of sVCAM-1 and sICAM-1 in patients with lyme disease. *Pol Arch Med Wewn* 119(1):200-204.
- Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. 2011. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 17(23):2801-2811.
- Chauhan G, Spurgeon CJ, Tabassum R, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mahajan A, Chavali S, Kumar MV, Prakash S, Dwivedi OP, Ghosh S, Yajnik CS, Tandon N, Bharadwaj D, Chandak GR. 2010. Impact of common variants of PPARG, KCNJ11, TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKN2A, IGF2BP2, and CDKAL1 on the risk of type 2 diabetes in 5,164 Indians. *Diabetes* 59(8):2068-2074.
- Cheng KK, Lam KS, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, Wong C, Xu A. 2007. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 56(5):1387-1394.
- Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. 2009. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 335(1):143-151.
- Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. 1999. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 104(1):93-102.

- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105:311-320.
- Cusi K, Ocampo GL. 2011. Unmet needs in Hispanic/Latino patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 124(10):2-9.
- Das Evcimen N, King GL. 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 55:498-510.
- Deepa SS, Dong LQ. 2009. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(1):E22-36.
- Díaz FM, Baiza GL, Díaz HMI, Pascoe LD, Guzmán GA, Kumate RJ. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Méd* 140(4):437-449.
- Dignat-George F, Boulanger CM. 2011. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(1):27-33.
- Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. 2012. Resultados nacionales 2012. <http://ensanut.insp.mx/basesdoctos.php#.UoEqgfkz3md>. Fecha de acceso: 9 de Noviembre de 2013.
- Finelli C, Tarantino G. 2013. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol* 19(6):802-812.
- Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE, Jr. 2009. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113(5):1112-1121.
- Galluccio E, Piatti P, Citterio L, Lucotti PC, Setola E, Cassina L, Oldani M, Zavaroni I, Bosi E, Colombo A, Alfieri O, Casari G, Reaven GM, Monti LD. 2008. Hyperinsulinemia and impaired leptin-adiponectin ratio associate

- with endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in subjects with in-stent restenosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(5):E978-986.
- Ginsberg HN. 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 106(4):453-458.
- Goldstein B, Müller-Wieland D. 2003. Pathogenesis of Type 2 Diabetes. Cap. 2 en *Type 2 Diabetes Principles and Practice*. Informa Healthcare, p. 13-23. New York, USA.
- Grajales CM, Vásquez G. 2012. Micropartículas como sustrato antigénico en lupus eritematoso sistémico. *Inmunología* 25(1):1-5.
- Hamburg NM, Larson MG, Vita JA, Vasan RS, Keyes MJ, Widlansky ME, Fox CS, Mitchell GF, Levy D, Meigs JB, Benjamin EJ. 2008. Metabolic syndrome, insulin resistance, and brachial artery vasodilator function in Framingham Offspring participants without clinical evidence of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 101:82-88.
- Hardie DG. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10):774-785.
- Hu FB. 2011. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care* 34(6):1249-1257.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20(1):22-27.
- International Diabetes Federation. 2013. Global Burden: Prevalence and Projections, 2010 and 2030. International Diabetes Federation. <http://www.idf.org/diabeatlas/5e/the-global-burden> Fecha de acceso: 20 de Agosto de 2013.
- Imamura M, Maeda S. 2011. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives. *Endocr J* 58(9):723-739.

- Jaitovich A, Jaim Etcheverry G. 2004. [Adhesion molecules. Their role in cardiovascular physiopathology]. *Medicina (B Aires)* 64(5):455-462.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. 2003. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol* 123(5):896-902.
- Kadowaki T, Yamauchi T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26(3):439-451.
- Kiezun M, Maleszka A, Smolinska N, Nitkiewicz A, Kaminski T. 2013. Expression of adiponectin receptors 1 (AdipoR1) and 2 (AdipoR2) in the porcine pituitary during the oestrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 11(1):18-19.
- Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. 2007. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117(1):2621-2637.
- Kim JH, Kim DJ, Jang HC, Choi SH. 2011. Epidemiology of micro- and macrovascular complications of type 2 diabetes in Korea. *Diabetes Metab J* 35(6):571-577.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 2004. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 94(4):e27-31.
- Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, Sakamoto T, Yoshimura M, Jinnouchi H, Ogawa H. 2005. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 45(10):1622-1630.

- Koppes LL, Dekker JM, Hendriks HF, Bouter LM, Heine RJ. 2005. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care* 28(3):719-725.
- Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR. 2003. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 166(2):387-394.
- Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Recalde A, Blanc-Brude O, Mees B, Vilar J, Tedgui A, Levy BI, Chimini G, Boulanger CM, Silvestre JS. 2009. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 119(21):2808-2817.
- Li P, Sun F, Cao HM, Ma QY, Pan CM, Ma JH, Zhang XN, Jiang H, Song HD, Chen MD. 2009. Expression of adiponectin receptors in mouse adrenal glands and the adrenocortical Y-1 cell line: adiponectin regulates steroidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 390(4):1208-1213.
- Lin LY, Lin CY, Su TC, Liao CS. 2004. Angiotensin II-induced apoptosis in human endothelial cells is inhibited by adiponectin through restoration of the association between endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 90. *FEBS Lett* 574(3):106-110.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. 2002. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360(9326):57-58.
- Lotfy M, Singh J, Kalasz H, Tekes K, Adeghate E. 2011. Medicinal Chemistry and Applications of Incretins and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Open Med Chem J* 5(2):82-92.
- Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ. 2006. APPL1 binds to

adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8(8):516-523.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7):412-419.c

Mercurio V, Carlomagno G, Fazio V, Fazio S. 2012. Insulin resistance: Is it time for primary prevention? *World J Cardiol* 4(1):1-7.

Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. 2008. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep* 60(1):75-84.

Miazgowski T, Dziwura-Ogonowska J, Safranow K, Iskierska K, Widecka K. 2014. Changes in adiponectin level and fat distribution in patients with type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 44(2):192-199.

Michiels C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196:430-443.

Milosz D, Czupryniak L, Saryusz-Wolska M, Zasadzinska G, Borkowska A, Cieplucha E, Chizynski K, Loba J. 2007. [Adiponectinemia, inflammatory process activity, and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes and acute coronary syndrome with ST elevation in relation to the severity of lesions in the coronary arteries]. *Pol Arch Med Wewn* 117:343-349.

Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(1):15-26.

Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA, Ouchi N. 2008. Adiponectin prevents cerebral ischemic

- injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation* 117(2):216-223.
- Ono K, Han J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12(1):1-13.
- Park KS. 2011. The search for genetic risk factors of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 35(1):12-22.
- Petrofsky JS. 2011. The effect of type-2-diabetes-related vascular endothelial dysfunction on skin physiology and activities of daily living. *J Diabetes Sci Technol* 5(1):657-667.
- Pérez BF. 2009. Epidemiología y fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Clin* 5(20):565-571.
- Plant S, Shand B, Elder P, Scott R. 2008. Adiponectin attenuates endothelial dysfunction induced by oxidised low-density lipoproteins. *Diab Vasc Dis Res* 5(2):102-108.
- Qu HQ, Li Q, Rentfro AR, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. 2011. The definition of insulin resistance using HOMA-IR for Americans of Mexican descent using machine learning. *PLoS One* 6(6):e21041.
- Roberts AC, Porter KE. 2013. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 10:472-482.
- Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. 2002. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 99(11):3962-3970.
- Saito T, Jones CC, Huang S, Czech MP, Pilch PF. 2007. The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem* 282(44):32280-32287.

- Schmid PM, Resch M, Schach C, Birner C, Riegger GA, Luchner A, Endemann DH. 2013. Antidiabetic treatment restores adiponectin serum levels and APPL1 expression, but does not improve adiponectin-induced vasodilation and endothelial dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Diabetol* 12(1):46-50.
- Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, Ouedraogo R, Hough K, McCue P, Chan L, Falkner B, Goldstein BJ. 2008. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118(5):1645-1656.
- Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K. 2008. Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett* 582(11):1607-1612.
- Spellman CW. 2010. Pathophysiology of type 2 diabetes: targeting islet cell dysfunction. *J Am Osteopath Assoc* 110(3):2-7.
- Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. 2010. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 11:61-74.
- Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, Arumugam TV. 2012. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol* 165(2):313-327.
- Tomizawa A, Hattori Y, Kasai K, Nakano Y. 2008. Adiponectin induces NF-kappaB activation that leads to suppression of cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin. *Diab Vasc Dis Res* 5(2):123-127.
- Tramontano AF, Lyubarova R, Tsiakos J, Palaia T, Deleon JR, Ragolia L. 2010. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm* 2010(1):250476.

- Ventura E, Davis J, Byrd-Williams C, Alexander K, McClain A, Lane CJ, Spruijt-Metz D, Weigensberg M, Goran M. 2009. Reduction in risk factors for type 2 diabetes mellitus in response to a low-sugar, high-fiber dietary intervention in overweight Latino adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 163(4):320-327.
- Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. 2001. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9:414-417.
- Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. 2007. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 298(22):2654-2664.
- World Health Organization. 2013. Diabetes. More about diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Fecha de acceso: 9 de Noviembre de 2014.
- Xin X, Zhou L, Reyes CM, Liu F, Dong LQ. 2011. APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(1):E103-110.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8(11):1288-1295.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423(6941):762-769.

- Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13(3):332-339.
- Yilmaz MI, Saglam M, Qureshi AR, Carrero JJ, Caglar K, Eyileten T, Sonmez A, Cakir E, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M, Stenvinkel P, Lindholm B, Axelsson J. 2008. Endothelial dysfunction in type-2 diabetics with early diabetic nephropathy is associated with low circulating adiponectin. *Nephrol Dial Transplant* 23(5):1621-1627.
- Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. 2006. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 55(5):2562-2570.