

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ.”  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.



BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN  
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

JOSÉ JUAN SOTO BAHENA  
MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO

DIRECTOR DE TESIS:

D.C MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

MORELIA, MICHOACÁN, JULIO DEL 2012.

## Agradecimientos:

A mis maestros D.C. Martha Eva Viveros Sandoval y Dr. Mario Humberto Cardiel Ríos, por todo el apoyo en la realización de este trabajo.

A mi comité tutorial: D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos, D.C Bertha Fenton Navarro y D.C. Ana Edith Higareda Mendoza por sus muy valiosas aportaciones para realizar este trabajo.

A mi esposa Dra. Mariana Vanessa Sánchez González por todo el amor comprensión y apoyo incondicional en todo momento.

A mis padres: José Guadalupe Soto Ortiz y Virginia Bahena Camarillo porque sin ustedes esto no sería posible.

A mis hermanas: Ángela Patricia Soto Bahena y Nelly Carolina Soto Bahena por su apoyo incondicional.

Lugar y dirección de tesis:

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de investigación “Dr. Mario Alvizouri”, el departamento de oftalmología, el departamento de imagen y el laboratorio del Hospital General “Dr. Miguel Silva”; en el laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular y el laboratorio de Citopatología molecular del departamento de estudios de posgrado de la facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, bajo la tutoría de la D.C. Martha Eva Viveros Sandoval.

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
2.1 DIABETES MELLITUS .....	10
2.1.1 <i>DEFINICIÓN</i> .....	10
2.1.2 <i>ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN</i> .....	10
2.1.3 <i>PATOGENIA</i> .....	11
2.2 BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL E INFLAMACIÓN. 14	
2.2.1 <i>CITOCINAS INFLAMATORIAS</i> .....	15
2.2.2 <i>FACTOR DE VON WILLEBRAND (vWF)</i> .....	17
2.2.3 <i>INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO 1 (PAI-1)</i> .....	18
2.2.4 <i>SISTEMA CD40/LCD40s</i> .....	19
2.2.5 <i>CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPC)</i> .....	20
2.3 MEDICIÓN DEL GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA POR ULTRASONIDO DOPPLER.....	22

**BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL: .....	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	26
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
6.1 SITIO DE ESTUDIO .....	27
6.2 MUESTRA .....	27
6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	28
6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	29
6.6 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	29
6.7 PROCEDIMIENTOS.....	30
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	34
6.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	35
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>57</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**FIGURA 1. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y  
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN DIABETES MELLITUS ----- 13**

**FIGURA 2. BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL E INFLAMACIÓN ----- 15**

**FIGURA 3. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN LA  
NEOVASCULARIZACIÓN ----- 21**

**FIGURA 4. REPARACIÓN ENDOTELIAL POR LAS CÉLULAS PROGENITORAS  
ENDOTELIALES ----- 22**

**FIGURA 5. ENSAYO DE ELISA TIPO "SANDWICH" ----- 32**

**FIGURA 6. ULTRASONIDO DOPPLER PARA MEDICIÓN DE ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA---- 33**

**BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1</b> CARACTERÍSTICAS GENERALES -----	37
<b>TABLA 2</b> COMPLICACIONES -----	38
<b>TABLA 3</b> CARACTERÍSTICAS GENERALES-PACIENTES DIABÉTICOS -----	39
<b>TABLA 4</b> RETINOPATÍA PACIENTES DIABÉTICOS-----	39
<b>TABLA 5</b> BIOMARCADORES PROTROMBÓTICOS -----	46
<b>TABLA 6</b> CORRELACIONES DE PROTEÍNA C REACTIVA -----	50
<b>TABLA 7</b> CORRELACIONES DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA -----	50
<b>TABLA 8</b> CORRELACIONES DE INTERLEUCINA 1 BETA -----	50
<b>TABLA 9</b> CORRELACIONES INTERLEUCINA 6 -----	51
<b>TABLA 10</b> CORRELACIONES DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES -----	51
<b>TABLA 11</b> CORRELACIONES FRAMINGHAM -----	51

**ÍNDICE DE GRÁFICAS**

<b>GRÁFICA 1</b> RIESGO CARDIOVASCULAR- FRAMINGHAM A 10 AÑOS-----	37
<b>GRÁFICA 2</b> GLUCOSA EN AYUNO Y 2 H POSPRANDIAL -----	41
<b>GRÁFICA 3</b> HEMOGLOBINA GLUCOSILADA E INSULINA EN AYUNO-----	41
<b>GRÁFICA 4</b> HOMA: RESISTENCIA A LA INSULINA Y % DE CÉL. BETA FUNCIONALES ---	42
<b>GRÁFICA 5</b> PERFIL DE LÍPIDOS-----	42
<b>GRÁFICA 6</b> VSG Y PROTEÍNA C REACTIVA -----	44
<b>GRÁFICA 7</b> FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA -----	44
<b>GRÁFICA 8</b> INTERLEUCINA 1-BETA E INTERLEUCINA 6 -----	45
<b>GRÁFICA 9</b> DETERMINACIÓN DE CD34+ Y EPC-----	48
<b>GRÁFICA 10</b> CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES Y CÉLULAS CD34+-----	48



## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

### Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ADA	Asociación Americana de Diabetes
Ag	Antígeno
ATPIII	Tercer panel de tratamiento para el adulto
ED	Disfunción Endotelial
EGO	Examen General de Orina
DE	Desviación Estándar
DMC	Grupo de Diabéticos Controlados
DMD	Grupo de Diabéticos Descontrolados
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ELISA	Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay
EPC	Células Progenitoras Endoteliales
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GC	Grupo de personas Control
HbA1c%	Porcentaje de Hemoglobina Glucosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HOMA-FCB	Homeostasis Model Assesment (Células $\beta$ Funcionales)
HOMA-IR	Homeostasis Model Assesment (Resistencia a la Insulina)
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intracelular 1
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IFN- $\gamma$	Interferón gama

## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IMC	Índice de Masa Corporal
IMT	Grosor de la Íntima Media Carotídea
KDa	Kilodaltones
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAF	Factor Activador de Macrófagos
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos
NF- $\kappa$ B	Factor Nuclear kappa B
NOM	Norma Oficial Mexicana
OB	Grupo de personas con Obesidad
ON	Óxido Nítrico
PAI-1	Factor Inhibidor del Plasminógeno tipo 1
PAI-2	Factor Inhibidor del Plasminógeno tipo 2
PCR	Proteína C Reactiva
QS	Química Sanguínea
RI	Resistencia a la Insulina
sCD40-L	Ligando CD40 soluble
TAd	Presión Arterial Diastólica

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

TAs	Presión Arterial Sistólica
TG	Triglicéridos
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
t-PA	Activador Tisular del Plasminógeno
u-PA	Activador del Plasminógeno tipo urokinasa
VCAM-1	Molécula de Adhesión de Células Vasculares
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular
vWF	Factor de Von Willebrand

## **1. INTRODUCCIÓN**

En el año 2000, aproximadamente 194 millones de personas en el mundo padecían DM (2.8% de la población mundial) y se espera sobrepase las 366 millones de personas para el 2030 (4.4% de la población mundial) (Wild S et al 2004; Steiner G 2006). Su prevalencia en México en el 2006 fue de 14.42%, que corresponden a 7.3 millones de mexicanos de la población general (Villalpando S et al 2010), se ha proyectado que existirán 11.7 millones de mexicanos con diabetes en el 2025 (Federación Internacional de Diabetes, 2003). Para los estados del centro occidente, entre ellos Michoacán en el 2006 la prevalencia fue de 18.3%(Villalpando S et al 2010).

La hiperglucemia crónica de la DM está asociada con el daño, disfunción y falla de varios órganos, principalmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Asociación Americana de Diabetes 2010). Es una de las 10 causas más frecuentes de hospitalización en adultos (Federación Internacional de Diabetes 2003). Desde el año 2000 la cardiopatía isquémica y la DM son las dos causas de muerte más frecuentes en México. Por lo que su atención es uno de los mayores retos del sistema de salud (Córdova-Villalobos JA et al 2008).

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 DIABETES MELLITUS**

#### **2.1.1 DEFINICIÓN**

La Diabetes Mellitus (DM) se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, consecuencia de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambos (Asociación Americana de Diabetes 2010).

#### **2.1.2 ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN**

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) ha clasificado la Diabetes de acuerdo a su etiología en cuatro grandes grupos: Diabetes Tipo 1, Diabetes Tipo 2, otros tipos específicos (aquí se encuentran los de componente genético, endocrinopatías, secundaria a fármacos, etc.) y Diabetes Mellitus Gestacional. La gran mayoría de los casos se encuentran en dos de estas categorías etiopatogénicas: Diabetes Tipo 1 (DM1) y Tipo 2 (DM2) esta última es con mucho la forma más común, constituye el 90% de los casos en el mundo.

En la DM2 se presenta una combinación de resistencia a la acción de la insulina e inadecuada respuesta de secreción de insulina compensatoria. La

## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

combinación de estas dos características dan como resultado la hiperglucemia, característica que al presentarse de una forma marcada provoca la aparición de los síntomas clásicos que incluyen: poliuria, polidipsia, pérdida de peso y en algunas ocasiones polifagia y visión borrosa. La etiología de la diabetes es inespecífica; se ha observado que el riesgo de presentarla aumenta con la edad, obesidad central u abdominal y sedentarismo. Ocurre con mayor frecuencia en mujeres con Diabetes Mellitus Gestacional previa y en individuos con hipertensión o dislipidemia y su frecuencia varía en diferentes razas y subgrupos étnicos. Está frecuentemente asociada a una fuerte predisposición genética, la cual es compleja y no está claramente definida (Asociación Americana de Diabetes 2010).

### **2.1.3 PATOGENIA**

La resistencia a la insulina (RI) es una característica distintiva de alteraciones metabólicas, incluidas DM2 y obesidad, las cuales se caracterizan también por la presencia de disfunción endotelial (DE) (Kim JA 2006). Estas alteraciones metabólicas son el factor de riesgo más importante para las enfermedades cardiovasculares (Ford SE 2005).

En conjunto los estudios celulares, fisiológicos, clínicos y epidemiológicos apoyan de manera importante la existencia de una relación recíproca entre RI y DE (Kim JA et al 2006; Bakker W et al 2009; Leteif AA

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

2005; Hamburg NM et al 2008; Balletshofer BM et al 2000; Pasimeni G et al 2006; Ardigo D et al 2006; de Aguilar et al 2006). Esta relación y la aterosclerosis resultante se ha observado principalmente en DM2 (Kim JA et al 2006; Bakker W et al 2009; Calles-Escandon J et al 2001; Benjamin EJ et al 2004; Meigs et al 2004; Tesouro M et al 2007; Meigs JB et al 2006).

La insulina desempeña un papel clave en la regulación de varios aspectos de la función y el metabolismo cardiovascular incluido el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos de cadena larga, traducción de proteínas, producción de óxido nítrico (ON) por el endotelio, tono vascular, aumento del flujo sanguíneo, entre muchas otras funciones (Bertrand L et al 2008).

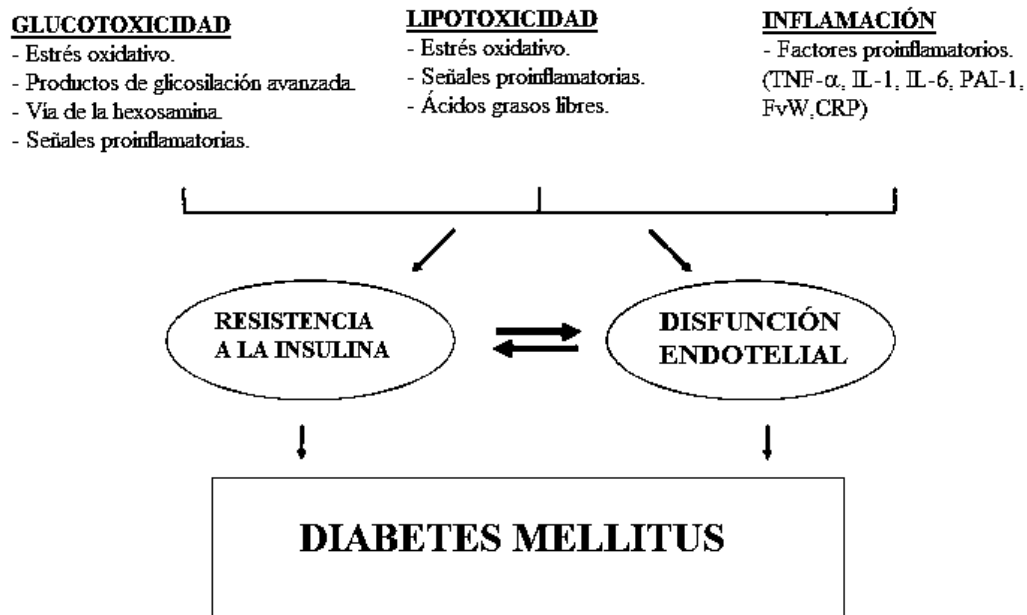
La **resistencia a la insulina (RI)** se define como la disminución de la capacidad de la insulina de estimular la captación de la glucosa por el músculo esquelético y el tejido adiposo y de suprimir la producción hepática de glucosa (Haffner 2003; Kim J et al 2008). Se ha propuesto como el paso inicial y la que juega el papel más importante en el desarrollo de DM2 (Savage BD et al 2005).

En los últimos años, se ha demostrado que el endotelio vascular no sólo cumple funciones de revestimiento sino que además se comporta como un órgano efector-receptor que responde a estímulos secretando las sustancias adecuadas para mantener el balance vasomotor y la homeostasis tisular regulando así también la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión plaquetaria (Esper JR et al 2006).

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

El término **disfunción endotelial (DE)** se refiere a una alteración en la capacidad del endotelio para mantener apropiadamente la homeostasis vascular. A pesar de que el término es usado frecuentemente en referencia a la pérdida de biodisponibilidad del óxido nítrico, la disfunción endotelial también incluye un aumento en la producción de vasoconstrictores, alteraciones en la regulación de la inflamación, trombosis, angiogénesis y aumento del nivel plasmático de otros productos endoteliales (Widlansky ME et al 2003; Tabit EC et al 2010). Los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen tanto a RI como a DE incluyen glucotoxicidad, lipotoxicidad e inflamación (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos de resistencia a la insulina y disfunción endotelial en Diabetes Mellitus**



## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

Estos mecanismos moleculares y fisiopatológicos subyacentes relacionan recíprocamente la RI y la DE y provocan un círculo vicioso que refuerza la relación entre las alteraciones metabólicas y cardiovasculares (Kim JA 2006; Tabit EC et al 2010). Se considera la disfunción endotelial como el evento inicial en el desarrollo de aterosclerosis (Creager MA et al 2003; Steffel J et al 2009) y por consiguiente del aumento del riesgo de presentar complicaciones cardiovasculares.

### **2.2 BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL E INFLAMACIÓN**

La búsqueda de marcadores bioquímicos de DE y predicción del riesgo de enfermedades cardiovasculares ha concentrado la investigación de varios grupos, la confluencia de algunas de sus hipótesis destacan la activación de factores relacionados con la inflamación, trombosis y alteración endotelial. Formas solubles de estas moléculas pueden ser detectadas en sangre periférica, sus niveles elevados se interpretan como marcadores de DE que revelan el inicio y/o progresión de cambios arterioscleróticos de la pared vascular.

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

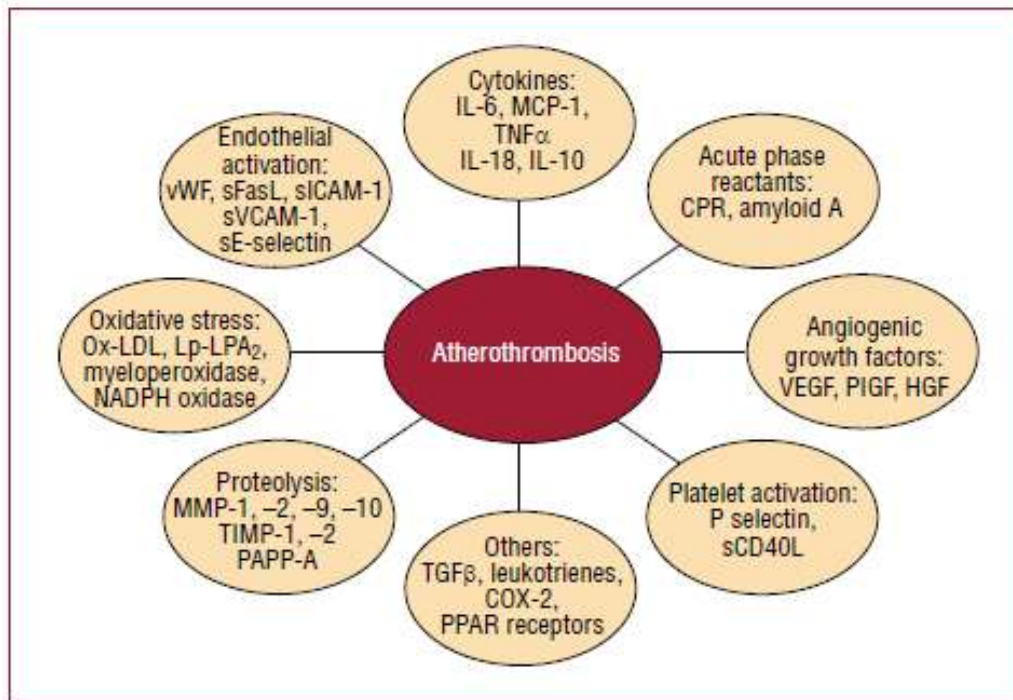


Figura 2. Biomarcadores de disfunción endotelial e inflamación

### 2.2.1 CITOCINAS INFLAMATORIAS

La DM2 está asociada con una respuesta inflamatoria crónica, caracterizada por la producción alterada de citocinas y activación de vías de señalización inflamatorias (Savage et al 2005; Beckman JA et al 2002). La aterosclerosis resultante de estas patologías es reconocida como una enfermedad inflamatoria (Libby P et al 2002) el endotelio vascular se encuentra afectado y además contribuye al proceso inflamatorio (Huang AL et al 2006).

La familia de las citocinas probablemente es el grupo de moléculas mediadoras de la inflamación más estudiadas que incluyen: Factor activador de

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

macrófagos (MAF), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), interleucinas (**IL-1**, IL-2, **IL-6**, IL-10, IL-12, IL-18, etc.), factor de necrosis tumoral alfa (**TNF- $\alpha$** ) y quimiocinas [IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ )]. Desempeñan diferentes funciones en el desarrollo de la inflamación y en el control de la duración y naturaleza de la respuesta inmune, principalmente por medio de la facilitación de las señales intercelulares (Tedgui A 2005). Estas tienen capacidad de “activar” el endotelio por vía de la activación del factor nuclear *kB* (NF-*kB*)(Monaco C et al 2006) y por consecuencia promover la expresión de moléculas de adhesión como: molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) y moléculas de adhesión intracelulares-1 (ICAM-1) y factores quimiotácticos (Proteína quimiotáctica de monocitos-1) que aceleran el proceso inflamatorio y el reclutamiento de los leucocitos en sitios arteriales específicos (Libby P et al 2002), lo que permite se inicie la expresión de la compleja cascada de mediadores inflamatorios. En sistemas experimentales la “activación” endotelial está relacionada a disminución de la actividad del ON derivado del endotelio, por la disminución en la expresión de la óxido nítrico sintetasa (Verma S et al 2002), la cual se inactiva por la unión con especies reactivas de oxígeno (ERO) cuya producción endotelial esta aumentada en respuesta a las citocinas (Stocker and Keaney 2004); esto acelera el proceso inflamatorio, promueve la trombosis y daña el tono vasomotor local (Huang LA et al 2006).

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

El **TNF- $\alpha$**  es una citocina inflamatoria potente que estimula la expresión de ICAM-1 y E-selectina que se une de forma preferente a los neutrófilos.

La **IL-1** induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 capaces de unirse a linfocitos y monocitos, respectivamente.

La **IL-6** es una citocina multifuncional que interviene en la respuesta inflamatoria e inmune, se produce en respuesta a varios factores incluidos: IL-1 y TNF- $\alpha$ . La IL-6 es el determinante primario de la inducción de síntesis de la proteína C-reactiva y de otras proteínas de fase aguda por el hígado. Las citocinas son producidas en varios sitios del organismo entre ellos el tejido adiposo y células inflamatorias como los macrófagos y linfocitos (Tedgui A 2005).

### 2.2.2 FACTOR DE VON WILLEBRAND (vWF)

El FvW es una glicoproteína multimérica con un tamaño de 500 a 20,000 kDa y 3 funciones biológicas principales: acarreador y protector del factor procoagulante VIII, mediador de la adhesión plaquetaria a la matriz sub-endotelial de los vasos sanguíneos dañados y mediador de la agregación plaquetaria. Actúa como puente de unión entre las glicoproteínas Ib (vía clásica) o IIb-IIIa (vía alternativa) expresadas en la superficie plaquetaria.

Es sintetizado por las células endoteliales y los megacariocitos. Se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los

gránulos alfa plaquetarios; la regulación de su liberación de estos sitios no se conoce completamente, se sabe que inductores de fase aguda como las citocinas proinflamatorias promueven su liberación. Los niveles plasmáticos de esta proteína han sido relacionados a DE en varios desórdenes vasculares (Virgós-señor B et al 2008) y DM2 (Ouviaña SM et al 2004)

### 2.2.3 INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO 1 (PAI-1)

En condiciones normales las células endoteliales producen activador tisular del plasminógeno (t-PA) para la formación de plasmina a partir del plasminógeno, actúa en unión a la trombina en el proceso de fibrinólisis. Sin embargo, el endotelio "activado" o disfuncional genera tanto tPA como uPA (activador tipo urokinasa) en presencia de trombina, disminuye su síntesis en respuesta a la IL-1 o TNF- $\alpha$ . Simultáneamente, las células endoteliales producen inhibidores del activador del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2), enzimas tipo serín-proteasas capaces de unirse e inactivar a los tPA y uPA, alterando la fibrinólisis. La trombina, IL-1 y TNF- $\alpha$  aumentan los niveles de PAI-1, potenciando, los mecanismos de aterogénesis al favorecer el depósito de fibrina en la pared arterial. Las causas desencadenantes de esta hiperproducción de inhibidores de la fibrinólisis permanecen inciertas, la insulina parece regular sus niveles plasmáticos, por lo que la RI altera los niveles de PAI-1 (Pandolfi A et al 2005; Tedgui A 2005).

#### 2.2.4 SISTEMA CD40/LCD40s

El sistema CD40/LCD40 son glicoproteínas transmembranales de 39-kD, relacionada estructuralmente con el TNF- $\alpha$ . Se expresan principalmente en los monocitos/macrófagos, células endoteliales, células del músculo liso y plaquetas (Tedgui A 2005).

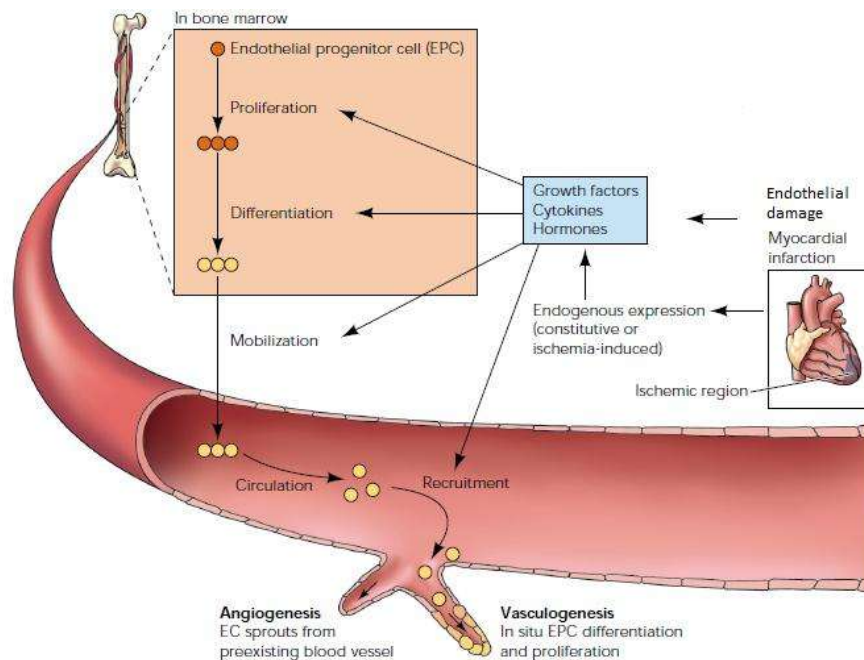
La interacción de este sistema en estas células provoca una serie de eventos que ocurren en la pared vascular y en la circulación durante la respuesta inflamatoria en curso, los cuales se identifican en un fenotipo inflamatorio y protrombótico observado tanto en los estadios tempranos como tardíos de aterosclerosis (Santilli F et al 2007). Al unirse el LCD40 sobre las células endoteliales y las células del músculo liso induce la expresión de moléculas de adhesión tales como VCAM-1, ICAM-1 y P-selectina, las cuales promueven el reclutamiento y extravasación de monocitos y linfocitos en el sitio de la lesión vascular. Este es también promovido por la secreción inducida por LCD40 de citocinas como la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por varias células. Finalmente las señales de CD40 inducen la expresión del Factor tisular, el cual promueve la coagulación sanguínea (Santilli F et al 2007). En conjunto todos estos eventos contribuyen al desarrollo de aterosclerosis.

### 2.2.5 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPC)

Las células endoteliales progenitoras son células inmaduras circulantes producidas en la médula ósea con la capacidad de diferenciarse en endotelio maduro y formar parte del mecanismo de neoangiogénesis (Asahara T et al 1997). Existen dos linajes: las hematopoyéticas y las endoteliales, (Fadini GP et al 2005) pueden movilizarse a sangre periférica en respuesta a varios estímulos (Aicher A et al 2005) como la isquemia tisular, factores de crecimiento y citocinas.

Durante la última década los datos disponibles indican que las alteraciones en las EPC pueden tener un papel importante como causa del desarrollo de prácticamente todas las complicaciones de la diabetes, lo que sugiere que tienen un papel trascendental en la biología cardiovascular; de hecho, la cantidad de EPC circulantes está actualmente considerada como un reflejo de la salud cardiovascular (Fadini GP et al 2007). Prácticamente todos los factores de riesgo para aterosclerosis han sido asociados con disminución y/o disfunción de las EPC circulantes (Werner N y Nickenig G 2006), así como un aumento de las EPC circulantes está asociada a una disminución de la mortalidad cardiovascular (Werner N et al 2005).

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2



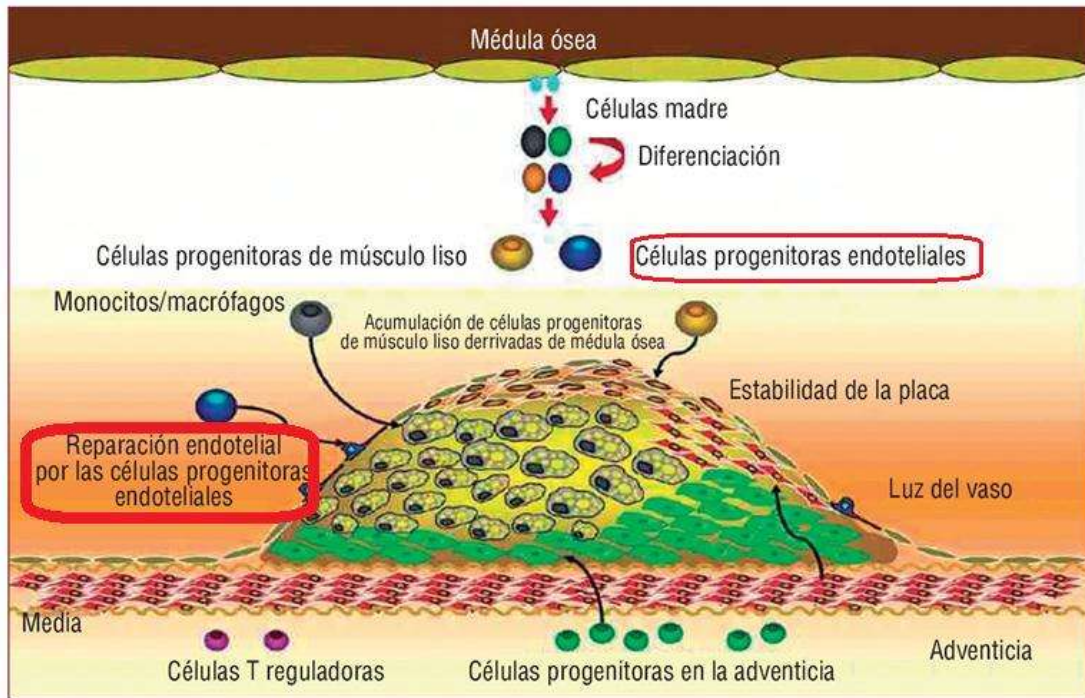
**Figura 3. Funciones de las células progenitoras endoteliales en la neovascularización**

El estudio de la biología de las EPC consiste en 2 aspectos relevantes: su evaluación cuantitativa y funcional. Las EPC circulantes pueden ser cuantificadas *ex-vivo* usando citometría de flujo, que es considerada el estándar de oro para este propósito (Rustemeyer P et al 2006); los antígenos de superficie típicos identificados en las EPC son CD34, CD133 y KDR. Las características funcionales son examinadas *in vitro* utilizando protocolos estandarizados (Urbich C y Dimmeler S 2004). Ambos métodos han demostrado que los pacientes diabéticos tipo 1 y Tipo 2 tienen menos EPC circulantes comparados con sujetos sanos. Además que las EPC de los diabéticos muestran alteraciones funcionales como disminución de su



## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

proliferación, adhesión, migración e incorporación dentro de las estructuras tubulares. (Fadini GP et al 2005; Loomans CJ et al 2004).



**Figura 4. Reparación endotelial por las células progenitoras endoteliales**

### 2.3 MEDICIÓN DEL GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA POR ULTRASONIDO DOPPLER

El ultrasonido doppler es el método de imagen más usado para valorar las propiedades estructurales de la pared vascular en estudios de carótidas pues da una evaluación no invasiva para detectar placas de ateroma, sus características y el grado de estenosis. Su utilidad se ha demostrado como método de tamisaje de riesgo cardiovascular en pacientes asintomáticos.

## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

Se ha demostrado que la íntima media carotídea se encuentra engrosada en pacientes diabéticos comparados con control y es considerado un estudio de valoración predictiva de eventos cardiovasculares similar a la puntuación de Framingham (Djaberi R et al 2008; Dejabeti R 2010; Bernad S et al 2005).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Se ha encontrado una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular en pacientes con Diabetes Mellitus tipo2 derivada de su evolución y relación con la aterosclerosis secundaria en gran parte al daño endotelial y subsecuente disfunción endotelial.

La Diabetes Mellitus tipo2 es un modelo de disfunción endotelial, por lo que la determinación de sus marcadores nos permitirá comprender parte de la fisiopatología y la relación de esta con probables aplicaciones en el diagnóstico, valoración, tratamiento y pronóstico de esta patología.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los marcadores de DE mantienen un gradiente en el nivel de expresión que va en disminución en pacientes diabéticos descontrolados, diabéticos controlados, pacientes obesos y sujetos del grupo control.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la expresión de marcadores de disfunción endotelial en pacientes diabéticos.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- A. Determinar el estado inflamatorio, protrombótico y de alteración de las células endoteliales.
- B. Analizar el estado del sistema de reparación endotelial mediante cuantificación de células progenitoras endoteliales circulantes.
- C. Determinar el estado metabólico mediante la determinación de las pruebas de laboratorio convencionales.
- D. Definir la relación de los resultados con los datos clínicos de los pacientes.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 SITIO DE ESTUDIO**

Unidad de investigación “Dr. Mario Alvizouri”, el departamento de oftalmología, el departamento de imagen y el laboratorio del Hospital General “Dr. Miguel Silva”; en el laboratorio de Hemostasia y Biología Vascul ar y el laboratorio de Citopatología molecular del departamento de estudios de posgrado de la facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.

### **6.2 MUESTRA**

La muestra total se dividió en cuatro grupos con un mínimo de 35 integrantes cada uno pareados por edad, género y tiempo e evolución ( $\pm 2$  años). 1.- Pacientes diabéticos descontrolados (DMD); 2.- Pacientes diabéticos controlados (DMC), 3.- Pacientes con obesidad (OB) y 4.- Grupo control (GC).

### **6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Es un estudio clínico descriptivo, prolectivo, transversal, observacional con 3 grupos de pacientes y 1 grupo control.

## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

### **6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

GRUPO 1 (DMD). Pacientes con DM2 de al menos dos años de diagnóstico clínico, controlados (Hemoglobina glucosilada <7%)(Criterio de la ADA).

GRUPO 2 (DMC). Pacientes con DM2, pareados con el grupo 1 por edad  $\pm 2$  años, género y tiempo de evolución de la diabetes ( $\pm 2$  años), descontrolados (Hemoglobina glucosilada >7%).

GRUPO 3 (OB). Pacientes con obesidad. Índice de Masa Corporal igual o mayor a 27 en estatura mayor de 1.60 m e igual o mayor a 25 en estatura menor a 1.6 de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 174-SSA 1-1998) pareados por edad  $\pm 2$  años y género con el grupo 1.

GRUPO 4 (GC). Grupo control, pareados con el grupo 1 por género y edad  $\pm 2$  años. Para fines de este estudio se definirá como sujeto del grupo control “sano” aquellos con historia clínica sin DM, con IMC < 25 y glucosa en ayunas y 2 horas posprandial normales, sin otras patologías crónicas.

Para todos los grupos:

1. Mayores de 18 años
2. Que sepan leer y escribir.
3. Que acepten participar y firmen carta de consentimiento informado.

### 6.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Enfermedad tiroidea, autoinmune, del tejido conectivo o maligna.
- Pacientes con comorbilidad grave que comprometa la participación del paciente y la interpretación de resultados a juicio del clínico.
- Pacientes con limitaciones prácticas para completar los exámenes clínicos y paraclínicos.
- Pacientes nefrópatas (creatinina sérica >2 mg/dl.).
- Pacientes con alguna complicación aguda actual de DM2.
- Pacientes con antecedentes de hepatitis aguda o crónica.

### 6.6 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Pacientes con estudios biológicos incompletos, o cuyas muestras biológicas no hayan sido almacenadas apropiadamente por lo que no se asegure su calidad para el estudio.



## 6.7 PROCEDIMIENTOS

En todos los participantes se realizó:

### **Valoración clínica**

-Historia clínica: Con énfasis en el interrogatorio de factores de riesgo cardiovascular y la medición de presión arterial, peso, talla, índice de masa corporal, circunferencia abdominal. Se calculó el riesgo de enfermedad cardiovascular a 10 años según la escala de Framingham. Se valoraron todos los participantes en la unidad de oftalmología del Hospital, siendo el observador (médico oftalmólogo) ciego a qué grupo pertenecía cada participante.

### **Determinaciones de laboratorio.**

-Se solicitó a los participantes una muestra de orina y se tomarán muestras de sangre periférica de las que se obtendrá suero y plasma para realizar: Glucosa, Urea, Creatinina, Ácido úrico, Hemoglobina glucosilada (HbA1C), perfil de lípidos y examen general de orina, en el laboratorio del H. General “Dr. Miguel Silva”.

### **Citometría de flujo.**

-Se realizó cuantificación de células endoteliales progenitoras utilizando el citómetro de flujo de la marca BECKMAN COULTER del laboratorio de citopatología molecular de la división de estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Se teñirán 500,000 células de sangre periférica con los anticuerpos monoclonales específicos

## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

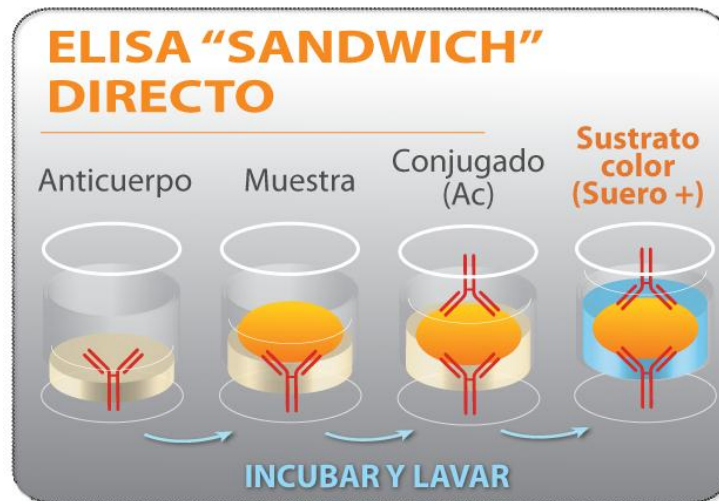
---

CD45, CD34, CD133 y KDR durante 30 minutos a temperatura ambiente , se lavarán 2 veces con PBS, centrifugándose posteriormente a 1000 rpm durante 5 minutos, se lisarán los eritocitos con cloruro de amonio incubándolos a 4 °C por 15 minutos, posteriormente se lavó 2 veces con PBS y nuevamente se centrifugó a 1000rpm durante 5 minutos, el botón celular se re suspenderá en 1 mL de PBS al 1% de paraformaldehído, la muestra se adquirió en el clitómetro de flujo y se cuantificará el porcentaje de células positivas.

### **Ensayo de ELISA.**

-La técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se basa en la detección de antígenos inmovilizados sobre una fase solida, mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto se mide por espectrofotometría.

Se congelaron las muestras de suero sanguíneo a -70°C para evitar variación interanalítica y posteriormente se determinó por técnica de ELISA tipo "SANDWICH" las concentraciones de: IL-1, IL-6, FNT- $\alpha$ , PAI-1, FvW, L-CD40; en el laboratorio de Biología Vascular de la división de posgrado de la facultad de Medicina.



**Figura 5. Ensayo de ELISA tipo "Sandwich"**

### **Medición del grosor de la íntima media carotídea por ultrasonido Doppler.**

La medición del grosor de la íntima media carotídea (IMT) se llevó a cabo utilizando un equipo ultrasonográfico de alta resolución modo B.

El ultrasonido doppler es el método de imagen más usado en estudios de carótidas pues proporciona una evaluación no invasiva para detectar placas de ateroma, sus características y el grado de estenosis. Se ha demostrado su utilidad como método de tamizaje de riesgo cardiovascular en pacientes asintomáticos.

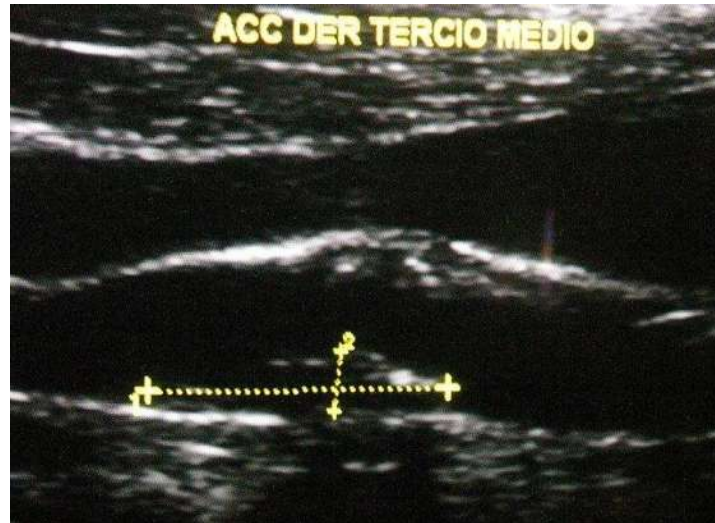
El examen se hace con transductores de alta resolución, y la exploración se hace en modo B en planos transversal y longitudinal, doppler color en planos longitudinal y transversal y doppler espectral en plano longitudinal. La medición del grosor del complejo íntima media muestra valores considerados normales

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

de .6 a .8 mm, entre .8 y 1.0 mm se considera indeterminado y más de 1.1 mm es el valor patológico mas aceptado.

Se realizó esta determinación a todos los participantes, siendo el observador (médico radiólogo) ciego a qué grupo pertenecía cada participante.



**Figura 6. Ultrasonido Doppler para medición de íntima media carotídea**

## 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar).

Se realizó la prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar la distribución de las variables.

La comparación entre los cuatro grupos para variables de distribución paramétrica se realizó con ANOVA, en las variables que se encontró significancia estadística se realizó pruebas post hoc tipo Tukey para las diferencias intergrupo.

La comparación entre los cuatro grupos para variables de distribución no paramétrica se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis, en las variables que se encontró significancia estadística se realizaron comparaciones intergrupo con la prueba de "U" de Mann-Whitney.

Se usó correlación bivariada no paramétrica (coeficiente de correlación de Spearman) para correlacionar los biomarcadores de disfunción endotelial con las variables de riesgo cardiovascular.

En todos los casos se considero significativo un valor de  $p < 0.05$  y un índice de confianza de 95%. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18 para Windows.

### 6.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto se apegó estrictamente a la normatividad vigente por la Secretaría de Salud para los estudios en humanos. Se realizó una carta de consentimiento informado la cual se presentó a cada uno de los pacientes participantes en el proyecto para su respectiva firma, la cual enfatizó la naturaleza del estudio, su carácter voluntario, los investigadores responsables, la ausencia de riesgos para su salud, los beneficios esperados, la manera como se pretende cuidar su integridad, la naturaleza confidencial de los datos y la salida voluntaria en caso de que así se desee. A los pacientes que en alguna de las pruebas se detectó como anormal se les informó y orientó con asesoría médica especializada y de ser necesario, la modificación de su tratamiento.

## **7. RESULTADOS**

### **A. Datos generales.**

Se incluyeron un total de 160 participantes distribuidos en los 4 grupos, en la tabla 1 se muestran sus características generales, cabe señalar que en las variables que se encontraron diferencias significativas fueron: *Escolaridad*, se observó que los DMD y DMC tienen un nivel de escolaridad en años menor al de los grupos OB y GC. En el *IMC* en el grupo de OB se observó mayor IMC y entre los grupos DMD y DMC no se observaron diferencias; el GC todos los integrantes presentaron un IMC <25. En la *TAS* se observan diferencias de los pacientes diabéticos con el GC. En *síndrome metabólico* es importante señalar que el 50% de los pacientes con OB lo presentaron y más del 85% de los pacientes con DM2 presentaron este síndrome.

En la figura 7 podemos observar que ambos grupos de pacientes diabéticos presentan un mayor riesgo a 10 años de presentar enfermedades cardiovasculares que los del grupo OB y GC.

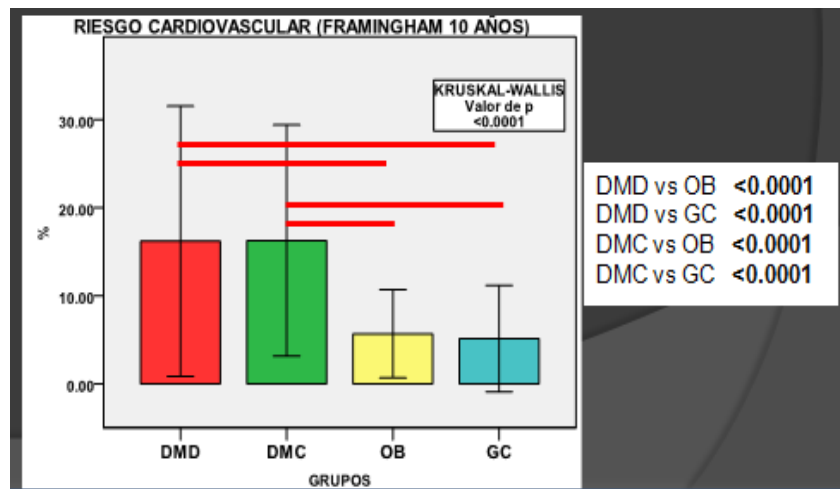
En la tabla 2 se observan algunas de las complicaciones importantes en las cuales no se encuentran diferencias significativas entre los grupos.

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

**Tabla 1 Características generales**

VARIABLES	DMD n=45	DMC n=36	OB n=40	GC n=39	KRUSKAL-WALLIS Valor de p	"U" MANN-WHITNEY Valor de p
Edad años (X/DE)	46.6 ±13.2	51.1 ±10.5	46.9 ±13.6	46.8 ±13.9	0.377*	
Género (H/M)	11/34	11/25	9/31	7/32	0.641	
Escolaridad años (X/DE)	7.3 ±4.2	7.1 ±4.8	9.9 ±5.3	11.4 ±5.6	<b>0.001</b>	DMD vs OB <b>0.017</b> DMD vs GC <b>0.001</b> DMC vs OB <b>0.015</b> DMC vs GC <b>0.001</b>
Menopausia	18 (52.9%)	15 (60%)	15 (48.3%)	13 (40.6%)	0.433	
Actividad física	20 (44.4%)	13 (36.1%)	11 (27.5%)	15 (38.5%)	0.448	
Tabaquismo	9 (20%)	2 (5.6%)	4 (10%)	5 (12.8%)	0.250	
Índice tabáquico (X/DE)	5.1 ±4	7.3 ±2.4	3.7 ±3.2	4.8 ±3.7	0.751*	
IMC (X/DE)	29.4 ±5	30.2 ±6	32.9 ±4.5	22.3 ±2.1	<b>&lt;0.0001</b>	DMD vs OB <b>&lt;0.0001</b> DMD vs GC <b>&lt;0.0001</b> DMC vs OB <b>0.012</b> DMC vs GC <b>&lt;0.0001</b> OB vs GC <b>&lt;0.0001</b>
<b>OBESIDAD</b>					<b>&lt;0.0001</b>	DMD vs OB <b>&lt;0.0001</b> DMD vs GC <b>&lt;0.0001</b> DMC vs OB <b>0.002</b> DMC vs GC <b>&lt;0.0001</b> OB vs GC <b>&lt;0.0001</b>
Peso Normal	8(17.8%)	6(16.7%)	0	39(100%)		
Sobrepeso	7(15.6%)	7(19.4%)	0			
Obesidad GI	26(57.8%)	18(50%)	31(77%)			
Obesidad GII	2(4.4%)	1(2.8%)	5(12.5%)			
Obesidad GIII	2(4.4%)	4(11.1%)	4(10%)			
TAS mm/Hg (X/DE)	121.8 ±22.8	121.7 ±21.1	111.7 ±11.6	108.4 ±17.7	<b>0.001</b>	DMD vs GC <b>0.001</b> DMC vs OB <b>0.040</b> DMC vs GC <b>&lt;0.0001</b>
TAD mm/Hg (X/DE)	77.7 ±10.7	77.7 ±11.7	72.4 ±13.6	70.4 ±10.9	<b>0.001</b>	DMD vs GC <b>&lt;0.0001</b> DMC vs GC <b>0.004</b> OB vs GC <b>0.019</b>
Síndrome metabólico (NCEP-ATPIII)	43 (95.6%)	32 (88.9%)	20 (50%)		<b>&lt;0.0001</b>	DMD vs OB <b>&lt;0.0001</b> DMD vs GC <b>&lt;0.0001</b> DMC vs OB <b>&lt;0.0001</b> DMC vs GC <b>&lt;0.0001</b> OB vs GC <b>&lt;0.0001</b>

\*ANOVA.



**Gráfica 1 Riesgo cardiovascular- Framingham a 10 años**



## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

Tabla 2 Complicaciones

VARIABLES	DMD n=45	DMC n=36	OB n=40	GC n=39	KRUSKAL- WALLIS Valor de p
Microproteínas en orina mg/dl (X /DE)	11.29 ±15	8.14 ±7.9	6.68 ±3.7	8.69 ±6.2	0.555
Grosor de íntima media carotídea mm(X /DE)	0.591 ±0.21	0.628 ±0.27	0.628 ±0.18	0.523 ±0.17	0.202
Placas de ateroma	3 (6.7%)	2 (5.6%)	2 (5%)		0.477

### B. Datos generales pacientes diabéticos.

Observamos en la tabla 3 las características generales y en la tabla 4 la presencia de retinopatía en estos pacientes de acuerdo a 2 clasificaciones de los pacientes con diabetes mellitus, son grupos muy homogéneos ya que no se encuentran diferencias significativas entre estos dos grupos en las variables analizadas.

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

**Tabla 3 Características generales-pacientes diabéticos**

VARIABLES	DMD n=45	DMC n=36	"U" MANN-WHITNEY Valor de p
Diagnóstico DM2 años (X /DE)	7.8 ±6	7.3 ±6.5	0.494
Hipertensión arterial sistémica	16 (35.6%)	13 (36.1%)	0.959
Diagnóstico HAS años (X /DE)	6.4 ±4.2	11.6 ±11.8	0.551
Síndrome metabólico (NCEP-ATPIII)	43 (95.6%)	32 (88.9%)	0.258
<b>FÁRMACOS</b>			0.552
Biguanidas	35(77.7%)	31(86.1%)	
Sulfonilureas	34(75.5%)	21(58.3%)	
Acarbosa	2(4.4%)	1(2.7%)	
Tiazolidinedionas	1(2.2%)	0	
Inh. DPP-4	0	1(2.7%)	
Insulina	8(17.7%)	5(13.8%)	
IECA	9(20%)	5(13.8%)	
ARA II	6(13.3%)	5(13.8%)	
Diuréticos	4(8.8%)	3(8.3%)	
B-bloqueadores	2(4.4%)	0	
Ca-antagonista	3(6.6%)	7(19.4%)	
Estatinas	3(6.6%)	7(19.4%)	
Fibratos	3(6.6%)	5(13.8%)	
Ezetimibe	2(4.4%)	1(2.7%)	

**Tabla 4 Retinopatía pacientes diabéticos**

VARIABLES	DMD n=45	DMC n=36	"U" MANN-WHITNEY Valor de p
RETINOPATÍA	7 (15.6%)	5 (13.9)	0.835
<b>CLASIFICACIÓN CLÍNICA</b>			0.835
Sin retinopatía	38(84%)	31(86%)	
No proliferativa LEVE	2(4.4%)	0	
No proliferativa MODERADA	2(4.4%)	4(11.1%)	
No proliferativa GRAVE	0	0	
PROLIFERATIVA	3(6.7%)	1(2.8%)	
<b>CLASIFICACIÓN ETDRS</b>			0.829
Sin retinopatía Microaneurismas	38(84%)	31(86%)	
No proliferativa LEVE	1(2.2%)	0	
No proliferativa MODERADA	1(2.2%)	1(2.8%)	
No proliferativa GRAVE	2(4.4%)	3(8.3%)	
No proliferativa MUY GRAVE	0	0	
Proliferativa NO ALTO RIESGO	0	0	
Proliferativa ALTO RIESGO	1(2.2%)	0	
Proliferativa AVANZADA	1(2.2%)	0	
	1(2.2%)	1(2.8%)	

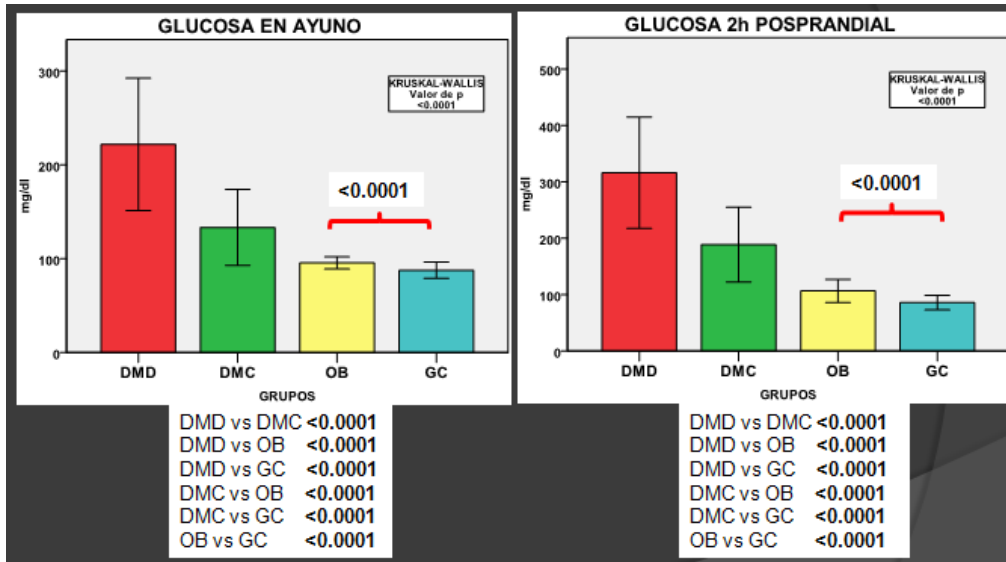
**C. Datos de laboratorio.**

Se observó un gradiente que va en aumento en los 4 grupos de estudio en las variables de *glucosa en ayuno*, *glucosa 2 horas posprandial* y *hemoglobina glucosilada* (gráficas 2 y 3), observándose una diferencia significativa aun entre el GC y el grupo de OB.

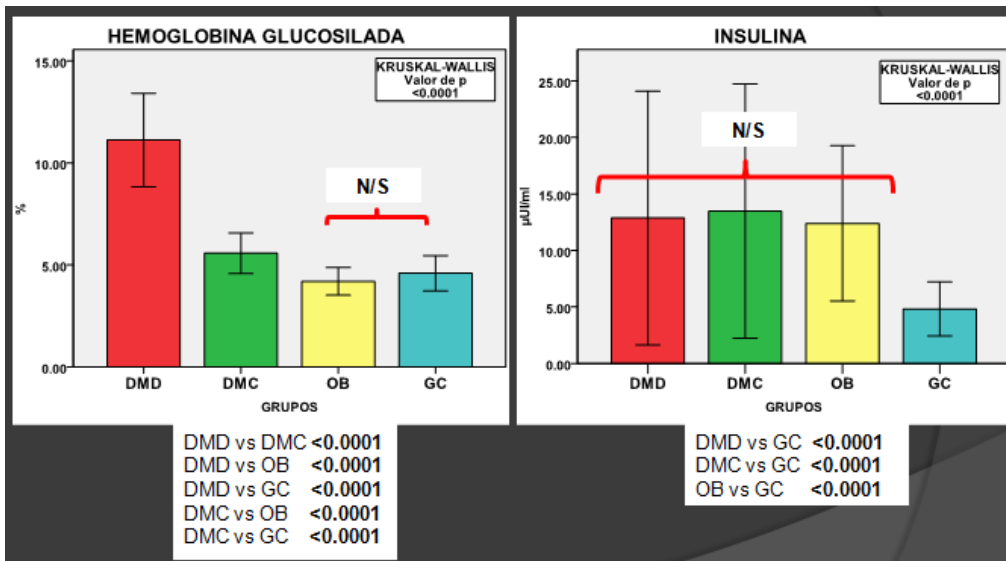
Se observa que existe una elevación en los niveles de *insulina* en los DMD, DMC y OB al compararlos con el GC, y no existen diferencias entre estos 3 grupos (gráfica 3). En la *resistencia a la insulina* medida por HOMA, se observa un gradiente en aumento en los 4 grupos y observamos que los grupos de DMC y OB no existen diferencias en esta variable (gráfica 4). Se observa un aumento en la *función de las células beta pancreáticas* medida por HOMA en el grupo de OB, y se observa una disminución de la funcionalidad en el grupo de DMD (gráfica 4).

En el perfil de lípidos no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos en el *colesterol total* y el *colesterol LDL*, sin embargo, se observaron diferencias en el *colesterol HDL* al comparar los DMD, DMC y OB con el GC; además se observó un gradiente en aumento en los 4 grupos en los *triglicéridos* (gráfica 5).

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

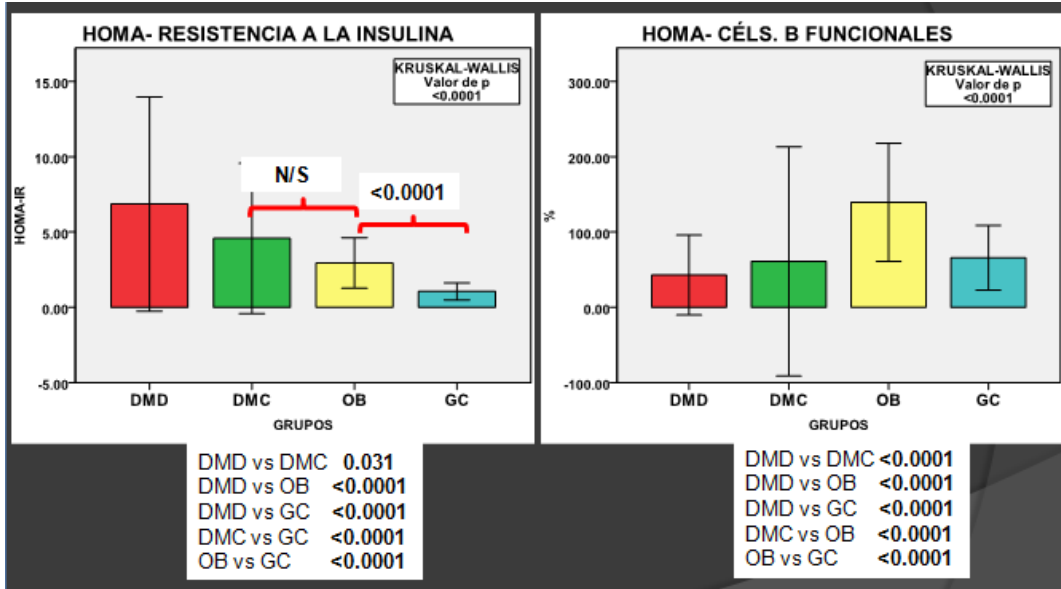


Gráfica 2 Glucosa en ayuno y 2 h posprandial

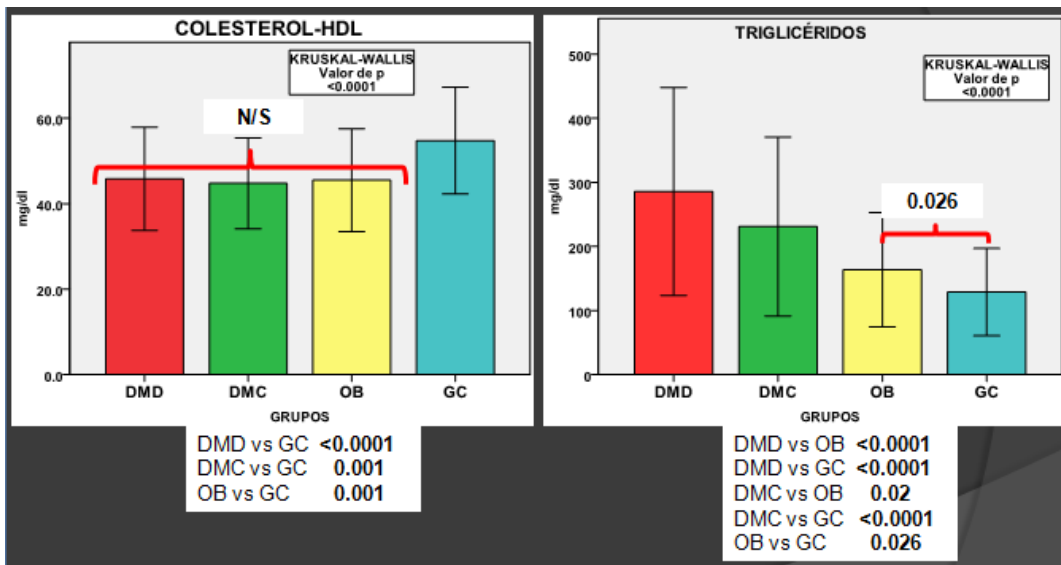


Gráfica 3 Hemoglobina glucosilada e insulina en ayuno

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2



Gráfica 4 HOMA: Resistencia a la insulina y % de células beta funcionales



Gráfica 5 Perfil de lípidos

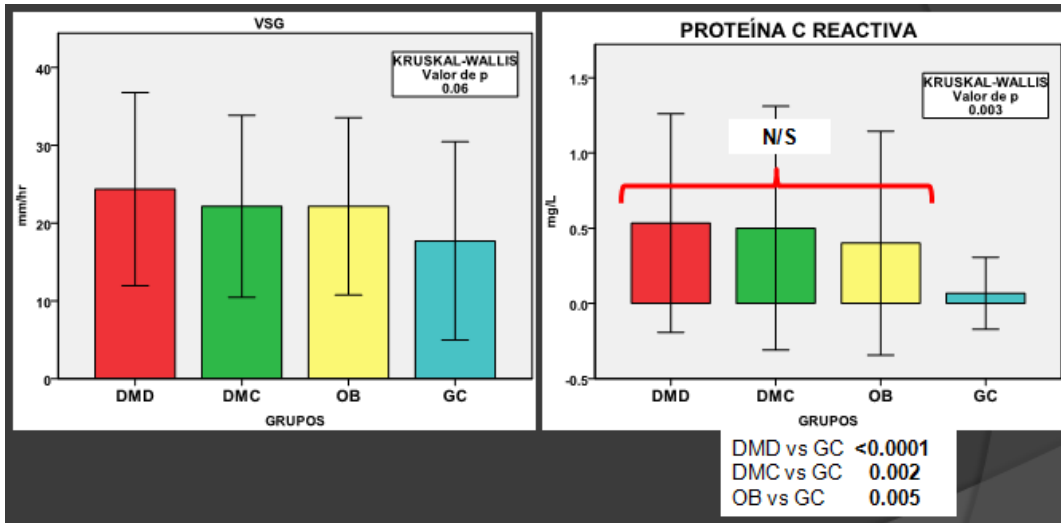
**D. Biomarcadores inflamatorios.**

En la *velocidad de sedimentación globular* medida por en el laboratorio del hospital general, se observo una tendencia al gradiente en aumento en los cuatro grupos sin embargo no se observó diferencia estadística entre estos. Se observó que existe una elevación en los niveles de *proteína C reactiva* en los DMD, DMC y OB al compararlos con el GC, sin embargo, no existen diferencias entre estos 3 grupos (gráfica 6).

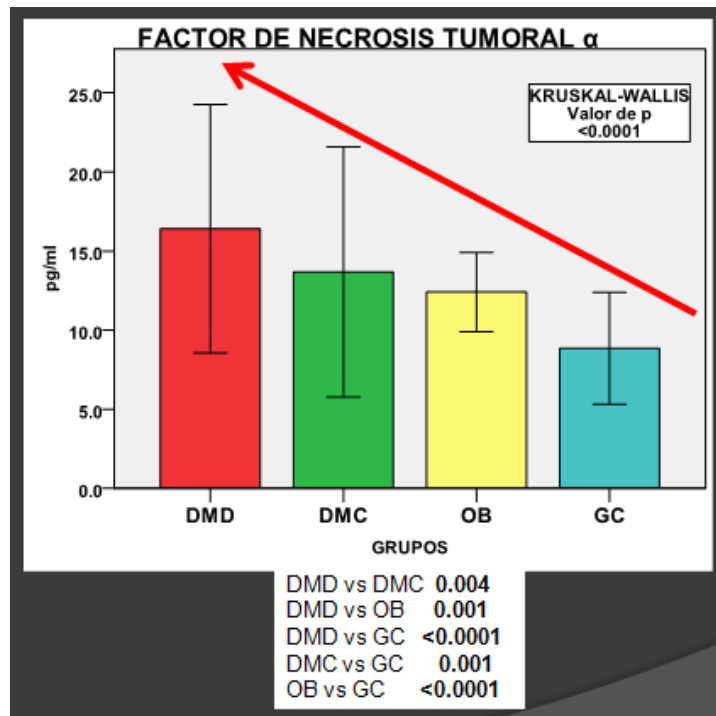
En el *factor de necrosis tumoral alfa* observamos un gradiente en aumento en su nivel de expresión entre los 4 grupos de estudio (gráfica 7).

En la *interleucina 1beta* observamos un aumento en las concentraciones en el grupo de DMC, de forma interesante el grupo que menor concentración de tiene es el OB. En la *Interleucina 6* observamos que el grupo que tiene una menor concentración es el de DMD y el de mayor concentración el DMC (gráfica 8).

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

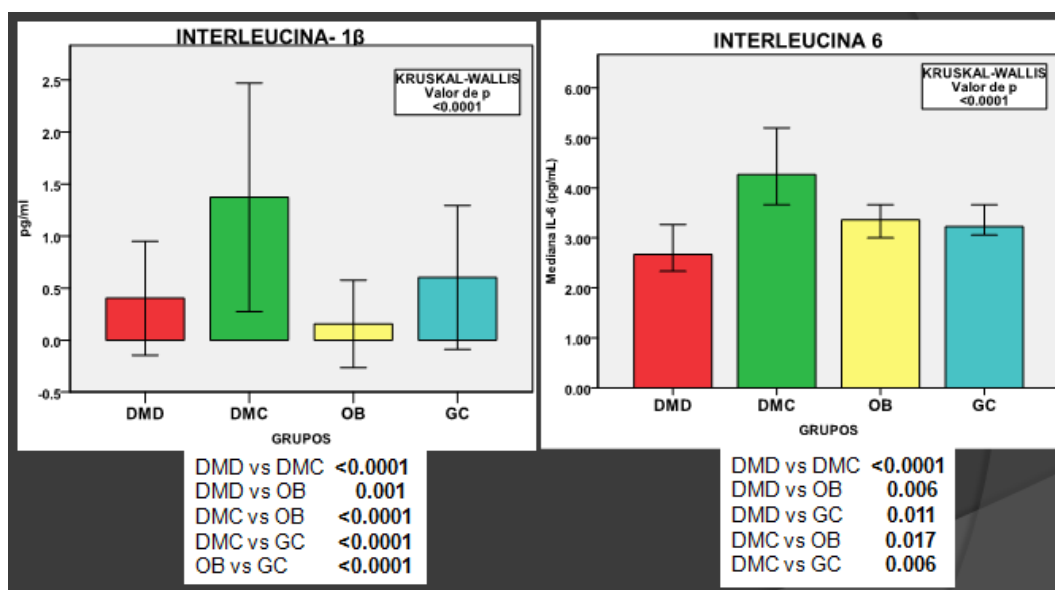


Gráfica 6 VSG y Proteína C reactiva



Gráfica 7 Factor de necrosis tumoral alfa

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2



Gráfica 8 Interleucina 1-beta e Interleucina 6



## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

### E. Biomarcadores protrombóticos.

Es importante señalar que en los biomarcadores protrombóticos: *plaquetas*, *VPM*, *CD40Ls* y *vWF* no se observó diferencia estadística entre los grupos (tabla5).

Tabla 5 Biomarcadores protrombóticos

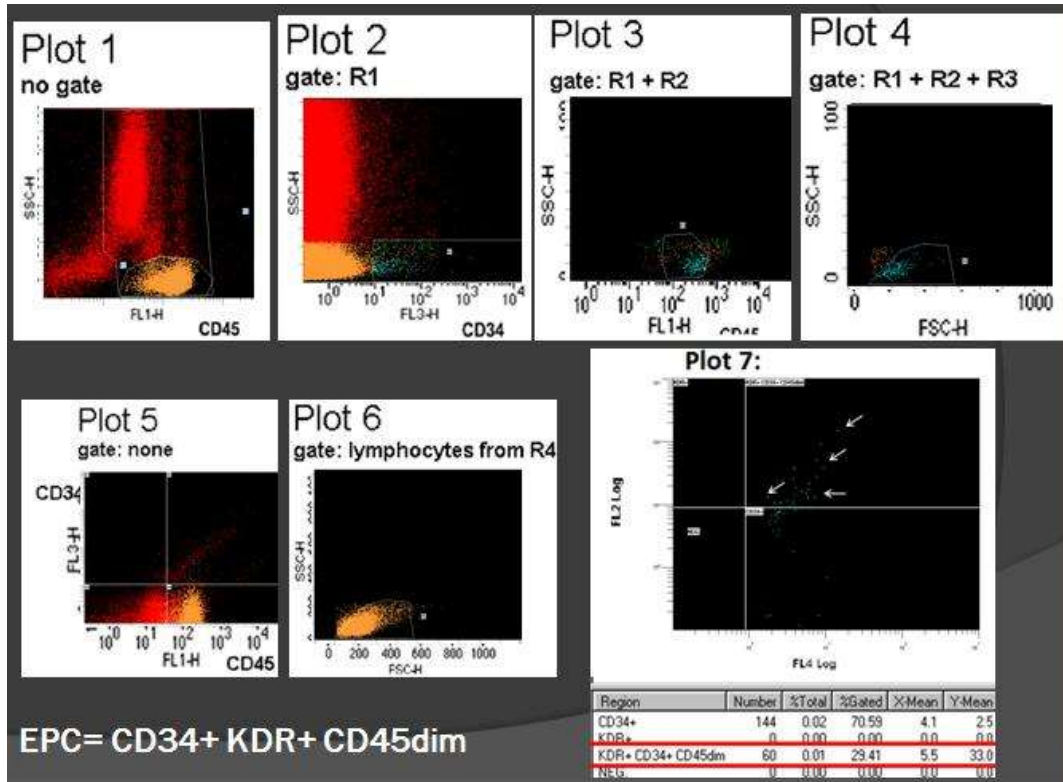
VARIABLES	DMD n=45	DMC n=36	OB n=40	GC n=39	KRUSKAL- WALLIS Valor de p
Plaquetas K/ $\mu$ L (X/DE)	248.7 $\pm$ 65.7	254.4 $\pm$ 78.3	245.2 $\pm$ 56.2	265.6 $\pm$ 60.1	0.530*
VPM fL (X/DE)	9.17 $\pm$ 0.99	8.76 $\pm$ 1.13	8.82 $\pm$ 0.88	8.69 $\pm$ 0.64	0.067
CD40L ng/ml (X/DE)	0.478 $\pm$ 0.60	0.469 $\pm$ 0.60	0.312 $\pm$ 0.30	0.418 $\pm$ 0.38	0.577
vWF % (X/DE)	111.6 $\pm$ 46.6	100 $\pm$ 46.2	108.9 $\pm$ 30.2	105.3 $\pm$ 37.4	0.621*

\*ANOVA.

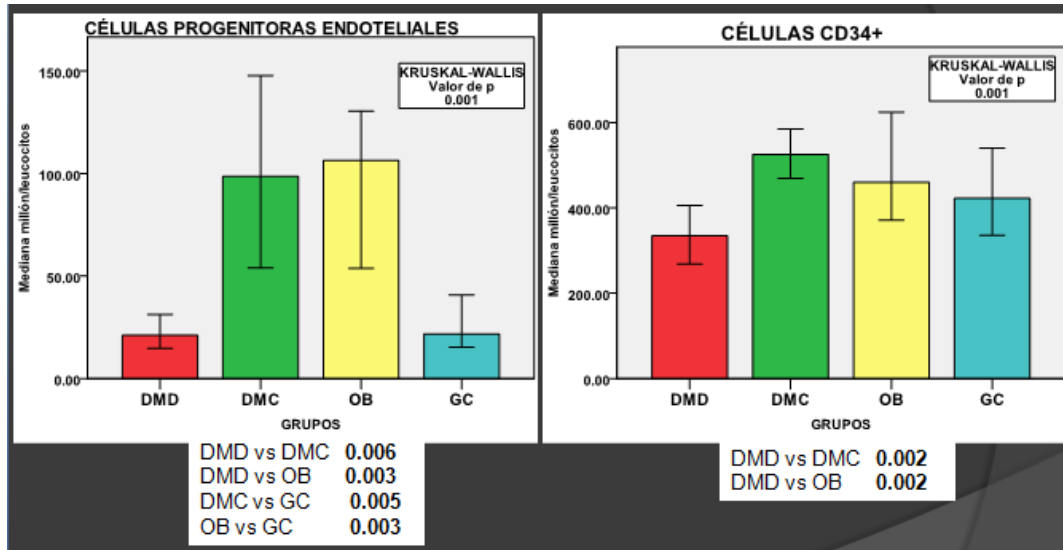
**F. Reparación endotelial.**

Se observó que existe un aumento de las *EPC* en los grupos de OB y DMC sin embargo, interesantemente en el grupo de DMD no se observó este aumento. En cuanto a las *células CD34+* se observa que existe una disminución significativa en el grupo de los DMD (gráfica 9 y 10).

**BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**



**Gráfica 9** Determinación de CD34+ y EPC (paciente del grupo DMC)



**Gráfica 10** Células progenitoras endoteliales y células CD34+

**G. Correlaciones.**

Se realizó correlación bivariada no paramétrica (coeficiente de correlación de Spearman) para correlacionar los biomarcadores de disfunción endotelial con las variables de riesgo cardiovascular. Se encontraron las siguientes correlaciones significativas: La proteína C reactiva tuvo una correlación positiva con la hemoglobina glucosilada, la VSG, la IL-6 y el vWF (tabla6). El factor de necrosis tumoral alfa se correlacionó positivamente con hemoglobina glucosilada, VSG, vWF y se correlacionó negativamente con colesterol HDL (tabla 7). La interleucina 1 beta se correlacionó de manera positiva con IL-6 y se encontraron 2 correlaciones negativas con EPC e IMC (tabla 8). La interleucina 6 se correlacionó positivamente con proteína C reactiva, VSG, IL 1 beta y se correlacionó negativamente con las EPC (tabla9). En las EPC se encontraron 3 correlaciones positivas con IMC, cintura e insulina, y 3 correlaciones negativas con hemoglobina glucosilada, IL1 beta e IL6 (tabla 10). La escala de riesgo cardiovasculas a 10 años según Framingham se correlacionó de manera positiva con la hemoglobina glucosilada, el factor de necrosis tumoral alfa y el vWF (tabla11).

**BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

**Tabla 6 Correlaciones de PROTEÍNA C REACTIVA (Spearman)**

<b>PROTEÍNA C REACTIVA</b>	<b>Hemoglobina glucosilada</b>	<b>VSG</b>	<b>IL-6</b>	<b>vWF</b>
<b>Rho</b>	0.202	0.194	0.231	0.203
<b>Valor de p</b>	<b>0.010</b>	<b>0.014</b>	<b>0.003</b>	<b>0.010</b>

**Tabla 7 Correlaciones de FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (Spearman)**

<b>FACTOR DE NECROSIS TUMORAL <math>\alpha</math></b>	<b>Hemoglobina glucosilada</b>	<b>VSG</b>	<b>vWF</b>	<b>Grosor íntima media carotídea</b>	<b>Colesterol HDL</b>
<b>Rho</b>	0.403	0.203	0.208	0.189	-0.316
<b>Valor de p</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.010</b>	<b>0.008</b>	<b>0.017</b>	<b>&lt;0.0001</b>

**Tabla 8 Correlaciones de INTERLEUCINA 1 BETA (Spearman)**

<b>INTERLEUCINA 1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>EPC</b>	<b>IMC</b>
<b>Rho</b>	0.301	-0.242	-0.185
<b>Valor de p</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.019</b>

**BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

**Tabla 9 Correlaciones INTERLEUCINA 6 (Spearman)**

<b>INTERLEUCINA 6</b>	<b>Proteína C reactiva</b>	<b>VSG</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>EPC</b>
<b>Rho</b>	0.231	0.199	0.301	- 0.200
<b>Valor de p</b>	<b>0.003</b>	<b>0.012</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.013</b>

**Tabla 10 Correlaciones de CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (Spearman)**

<b>EPC</b>	<b>IMC</b>	<b>Cintura</b>	<b>Insulina</b>	<b>Hemoglobina glucosilada</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>
<b>Rho</b>	0.252	0.236	0.161	- 0.379	- 0.242	- 0.200
<b>Valor de p</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	<b>0.045</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.013</b>

**Tabla 11 Correlaciones Framingham (Spearman)**

<b>RIESGO DE FRAMINGHAM</b>	<b>Hemoglobina glucosilada</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>vWF</b>
<b>Rho</b>	0.437	0.295	0.221
<b>Valor de p</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.005</b>

## **8. DISCUSIÓN**

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo occidental (Murray CJ et al 1997); a partir del año 2000 a la fecha la cardiopatía isquémica y la diabetes mellitus, dos enfermedades cardiovasculares, son la causa de muerte más frecuente en México. Por lo que su atención se ha transformado en uno de los mayores retos de los sistemas de salud (Córdova-Villalobos JA et al 2008). El proceso patológico subyacente a las enfermedades cardiovasculares es un engrosamiento de la pared arterial debido a la formación de placas ateroscleróticas, las cuales se complican frecuentemente con un trombo y pueden dar lugar a síndrome coronario agudo o accidente cerebrovascular. Uno de los mayores retos de la medicina cardiovascular es encontrar la manera de predecir el riesgo de un sujeto de sufrir un evento cardiovascular. En las últimas décadas, existe un gran interés en la búsqueda de biomarcadores que puedan ser identificados a nivel sanguíneo con implicaciones en el diagnóstico, tratamiento, evolución y pronóstico en las enfermedades denominadas de riesgo cardiovascular (Vivanco F et al 2005).

En este estudio se observó el comportamiento de algunos de los biomarcadores de disfunción endotelial, que intervienen en los procesos inflamatorio, protrombótico y de remodelación vascular que juegan un papel primordial en la fisiopatología de la diabetes mellitus, así como el estudio comparativo con un grupo de personas con obesidad que se ha constituido en

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

las últimas décadas como un problema de salud pública en nuestro país y uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus.

En las variables de control glucémico: glucosa en ayuno, glucosa 2 horas postprandial y hemoglobina glucosilada se observó un gradiente en el nivel de expresión que va en aumento entre los 4 grupos, aun entre los grupos de OB y GC se observa una diferencia estadística en glucosa en ayuno ( $p < 0.0001$ ) y glucosa 2 horas postprandial ( $p < 0.0001$ ). Esto es de gran importancia ya que se demuestra que aún en la obesidad se encuentra una alteración de importancia en el manejo de los carbohidratos. Se observa en el grupo de obesidad un aumento en las concentraciones de insulina en ayuno, si observarse diferencia con los grupos de diabéticos, es decir que el grupo con obesidad presenta las mismas concentraciones de insulina en ayuno que los pacientes diabéticos. En cuanto a la resistencia a la insulina medida por HOMA observamos un gradiente en el nivel de expresión entre los 4 grupos, en los integrantes del grupo de OB se observó la misma resistencia a la insulina que los pacientes con DMC, el grupo de OB se encuentran ya en un estado de resistencia a la insulina. En la funcionalidad de las células beta pancreáticas medidas por HOMA se observó una hiperfuncionalidad en el grupo de OB y un disminución en esta funcionalidad en el grupo de DMC y aun menor funcionalidad en los DMD, lo que coincide con la bibliografía que describe las etapas previas de la diabetes mellitus con una hiperfunción y una disminución progresiva dependiente del daño en los pacientes con diabetes mellitus.



## **BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

---

En el perfil de lípidos se observó que en los 3 grupos de pacientes DMD, DMC y OB una disminución en las concentraciones de colesterol HDL, en cuanto a la concentración de triglicéridos existe un gradiente en aumento en los cuatro grupos, en el colesterol total y colesterol LDL no se observaron diferencias con significancia. Es importante resaltar el hecho conocido que una de las comorbilidades más frecuentemente asociadas a la DM2 son las dislipidemias, aun en las personas con obesidad se observa una gran prevalencia de dislipidemias y en este estudio se observó que un 50% de las personas con obesidad presentan síndrome metabólico según la NCP-ATPIII caracterizado principalmente por 3 de sus componentes, aumento de cintura y triglicéridos y disminución del colesterol HDL.

En los biomarcadores de inflamación se observa un aumento que sigue un gradiente en aumento en la proteína C reactiva y factor de necrosis tumoral alfa lo que confirma la literatura del proceso inflamatorio subclínico tanto en diabetes mellitus como en obesidad. Se observa además una disminución en las interleucinas tanto 1 como 6 en el grupo de DMD probablemente debido a una alteración del sistema inmunológico, por probable glicación no enzimática de algunos receptores de las células del sistema inmune.

En cuanto a los biomarcadores protrombóticos no se observó diferencias importantes entre los grupos, probablemente debido a que son marcadores que se elevan en etapas más avanzadas de daño endotelial.

En el sistema de reparación endotelial se observa un aumento probablemente como mecanismo de defensa en el número de EPC en los

grupos de DMC y OB, sin embargo en los DMD las EPC no se observan aumentadas debido probablemente al daño en las funciones de proliferación, diferenciación y movilización de las células progenitoras de la médula ósea, y al aumento de la apoptosis de estas células como consecuencia del daño por la presencia de un proceso inflamatorio mayor y aumento importante en glucosa sanguínea.

### **9. CONCLUSIONES**

Se corrobora que los pacientes con diabetes mellitus tienen un proceso inflamatorio subclínico importante, y aun más las personas con obesidad mantienen un proceso inflamatorio subclínico, lo cual aumenta considerablemente su riesgo de padecer diabetes mellitus. El sistema de reparación endotelial se encuentra alterado tanto en obesidad como en diabetes mellitus, aun más en los pacientes con diabetes mellitus descontrolada.

## **10. PERSPECTIVAS**

Es importante en estudios posteriores analizar la respuesta de los biomarcadores de disfunción endotelial y aun más en el sistema de reparación endotelial (células progenitoras endoteliales) bajo el tratamiento adecuado para mejorar el control glucémico en los pacientes con diabetes mellitus descontrolada y con un tratamiento de control de peso y alimentación en el grupo de pacientes con obesidad.

**11. BIBLIOGRAFÍA**

- Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. Hypertension 2005;45:321–325.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Position Statement). Diabetes Care 2010; 33 (Suppl. 1):S62-S69.
- Ardigo D, Franzini L, Valtuena S, Monti LD, Reaven GM, Zavaroni I. Relation of plasma insulin levels to forearm flow-mediated dilatation in healthy volunteers. Am J Cardiol 2006;97:1250–1254.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275:964–967.
- Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. Cell Tissue Res 2009;335:165–189.
- Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. Circulation 2000;101:1780–1784.
- Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. JAMA 2002;287(19): 2570-2581.

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

- Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, et al. Clinical correlates and heritability of endothelial function in the community: the Framingham heart study. *Circulation* 2004;109:613–619.
- Bernard S, Serusclat A, Targe F, Charriere S, Roth O, Beaune J, Berthezene F, Moulin P. Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2005; 28: 1158-1162.
- Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL. Insulin signaling in the heart. *Cardiovascular Research* 2008; 79: 238-248.
- Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev* 2001;22:36–52.
- Córdova-Villalobos JA, Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda A, Barquera S, Rosas-Peralta M, Hernández-Ávila M, León-May ME, Aguilar-Salinas CA. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México* 2008; 50 (5): 419-427.
- Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003;108:1527–1532.
- de Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, et al. Metformin improves endothelial vascular reactivity in firstdegree relatives of type 2 diabetic patients with

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2006;29:1083–1089.

- Djaberi R, Beishuizen ED, Pereira AM, Rabelink TJ, Smith JW, Tamsma JT, Huisman MV, Jukema JW. Non-invasive cardiac imaging techniques and vascular tools for the assessment of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51: 1581-1593.
- Djaberi R, Schuijf JD, Jukema JW, Rabelink TJ, Stokkel JW, Smith JW, de Koning EJ, Bax JJ. Increased carotid intima-media thickness as a predictor of the presence and extent of abnormal myocardial perfusion in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33 (2): 372-374.
- Esper JR, Nordaby AR, Vilariño OJ, Paragano A, Cacharrón LJ, Machado AR. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology* 2006; 5 (4): 1-18.
- Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Characterization of endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:1–2.
- Fadini GP, Agostini C, Avogaro A, Sartore S. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with Diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30(5): 1305-1313.
- Ford SE. Risks for All-Cause Mortality, Cardiovascular Disease, and Diabetes Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 2005; 28:1769–1778.
- Haffner SM. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 61 (1): S9-S18.

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

- Hamburg NM, Larson MG, Vita JA, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance, and brachial artery vasodilator function in framingham offspring participants without clinical evidence of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2008;101:82–88.
- Huang LA, Vita AJ. Effects of systemic inflammation on endothelium-Depent vasodilation. *Treds Cardiovasc Med* 2006; 16(1): 15-20.
- International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 2da ed. Bruselas, Bélgica: International Diabetes Federation, 2003.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888–1904.
- Kim J, Wei Y, Sowers RJ. Role of Mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ. Res.* 2008; 102: 401-414.
- Libby P, Ridker MP, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
- Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53:195–199.
- Lteif AA, Han K, Mather KJ. Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation* 2005;112:32–38.

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

- Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004;291:1978–1986.
- Meigs JB, O'Donnell CJ, Tofler GH, et al. Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2006;55:530–537.
- Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovascular Research* 2006; 61: 671-682.
- Murray CJ, López AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet*. 1997;349:1269-76.
- Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, Alberta MM, Calafiore A, Pellegrini G, Vitacolonna E, Capani F, Consoli A. Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Is Increased in the Arterial Wall of Type II diabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1378-1382.
- Pasimeni G, Ribaud MC, Capoccia D, et al. Non-invasive evaluation of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity: relationship with insulin resistance. *Microvasc Res* 2006;71:115–120.
- Ouviaña SM, Palmer L, Sasseti B. Endotelina-1, óxido nítrico y factor de von Willebrand en pacientes hipertensos diabéticos tipo 2. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2004; 38(4): 471-6.



## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

- Rustemeyer P, Wittkowski W, Jurk K, Koller A. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. *J Immunoassay Immunochem* 2006; 27: 77–88.
- Santilli F, Basili S, Ferroni P, Daví G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med* 2007; 2: 256-268.
- Savage BD, Petersen FK, Shulman IG. Mechanism of insulin resistance in human and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005; 45: 828-833.
- Steffel J, Lüscher TF. Predicting the development of atherosclerosis. *Circulation* 2009; 119:919-921.
- Steiner G. Implications of the global diabetes epidemic. *Diabetes and vascular disease reserch* 2006; 3 (Suppl. 1): S2-S5.
- Stocker R, Keaney FJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-1478.
- Tabit EC, Chung BW, Hamburg MN, Vita AJ. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11 (1): 61-74.
- Tedgui A. The role of inflammation in atherothrombosis: implication for clinical practice. *Vasc Med* 2005; 10: 45-53.
- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95:343–353.
- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Ávila MA, Gaona B, Rebollar R, Hernández L. Prevalence and distribution of type 2

## BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

---

- diabetes Mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. *salud pública de méxico* 2010; 52(1): S19-S26.
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont SA, Paul WM, Fedak, Badiwala VM, Dhillon B, Weisel DR, Li RK, Mickle DAG, Stewart JD. A Self-Fulfilling Prophecy: C-Reactive Protein Attenuates Nitric Oxide Production and Inhibits Angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913-919.
  - Virgós-Señor B, Nebra-Puertas A, Suárez-Pinilla MA, Cornudella-Lacasa R, Portero-Pérez P. Factor de von Willebrand, lesión endotelial y cardiopatía isquémica. *Medicina Intensiva* 2008; 32(3): 103-9.
  - Vivanco F, Martín-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco-Colio L, Dardé VM, et al. Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2005;4:1181-91.
  - Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353:999–1007.
  - Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:257–266.
  - Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149–1160.
  - Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-53.