



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TESIS

“Marcadores de disfunción endotelial asociados con riesgo cardiovascular en jóvenes con obesidad y peso normal”

PRESENTA:

Q.B.P. CITLALLI TORNEZ BENITEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ISELA PARRA ROJAS

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRIS PAOLA GUZMÁN GUZMÁN.

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GUERRERO., OCTUBRE DE 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de junio de dos mil trece, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "**Marcadores de disfunción endotelial asociados con riesgo cardiovascular en jóvenes con obesidad y peso normal**", presentada por la alumna Citlalli Tornez Benitez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Isela Parra Rojas
Dirección de tesis

Dr. Gerardo Huerta Beristáin

Dra. Adakatia Armenta Solís

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dr. José Francisco Muñoz Valle



Vo.Bo
Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas



Vo.Bo
Dra. Eugenia Flores Alfaro
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en colaboración con el área de Citometría de Flujo del Laboratorio de Investigación del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”.

Bajo la Dirección de:

Dra. Isela Parra Rojas

Codirección de:

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Asesoría externa de:

Dr. José Francisco Muñoz Valle

La asesoría de:

Dra. Adakatia Armenta Solís

Dr. Gerardo Huerta Beristaín

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP/103.5/12/8035).

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas la C. Citlalli Tornez Benitez, recibió beca del CONACYT.

Agradecimientos:

A mi comité tutorial, Dra. Isela Parra Rojas, Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán, Dr. José Francisco Muñoz Valle, Dra. Adakatia Armenta Solís, Dr. Gerardo Huerta Beristáin y al Dr. Lorenzo Salgado Goytia agradezco su apoyo, motivación, paciencia y sugerencias aportadas durante la realización del presente trabajo, así como por el tiempo que dedicaron a la revisión del mismo.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo (Coordinadora de Seminario), por su tiempo, paciencia, amistad y sugerencias realizadas para la redacción del presente trabajo.

A la Bióloga Lorena Téllez Aztorga, por TODO su tiempo dedicado en la asesoría de la técnica de citometría de flujo, por su apoyo, amistad y paciencia.

A el Dr. Víctor Hugo Garzón Barrientos y a la M en C. Mónica Virginia Saavedra Herrera, por las facilidades otorgadas para realizar la técnica de citometría de flujo en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”.

A los compañeros del LIOD, por su apoyo en la parte técnica del proyecto: Q.B.P. Aralia, M en C. Luz Elena, Q.B.P. Lionela, Q.B.P. Nadia, etc.

A Efra, Karen, Pavel, Pepe Toño y Narita por su apoyo incondicional, amistad, cariño y lo más importante por confiar en mí!! Muchas gracias!!

A TODOS mis compañeros de generación de la Maestría (Alfredo, Lupita, Ana Lilia, Cahua, Carlitos, Romi, Karen, Azu, Fredy, Mire, Shavi, Dani, Itzel, Luis, Anahí), por su amistad y gran apoyo que me brindaron en los momentos que más necesite de ustedes, así también por TODOS los momentos tan agradables que pasamos.

A mis compañeros del LESP (M en C. Norma, Wendy, Mili, Julio, Irma, Viry, Maxi, Ene y Mario) por su amistad y apoyo brindado para la culminación de una meta más en mi vida.

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Material y métodos.....	8
Resultados	11
Discusiones.....	20
Conclusiones.....	24
Anexos.....	25
Bibliografía.....	34

Resumen

La obesidad favorece la disfunción endotelial causando el desprendimiento de las células endoteliales y la sobreexpresión de moléculas de adhesión celular. **Objetivo.** Evaluar la relación del número de células endoteliales en circulación y de los niveles de sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina, con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales en jóvenes con y sin obesidad. **Metodología.** Se realizó un estudio que incluyó 119 jóvenes universitarios, con edades entre 18-28 años: 66 normopeso y 53 con obesidad. Se les aplicó una encuesta y realizó evaluación de la composición corporal y perfil metabólico. A partir de una muestra de sangre periférica y mediante citometría de flujo, se cuantificó el número circulante de células endoteliales maduras (CEMc) definidas como; CD146⁺/CD34⁺/CD45⁻ y progenitoras (CEP); CD34⁺/CD133⁺/CD45⁻. Los niveles de sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina fueron determinados por el método de ELISA. El análisis estadístico se realizó mediante el Software STATA v.9.2. La relación y asociación del número de CEM y los parámetros evaluados se estableció mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r^*), y regresión lineal. Considerando una significancia estadística un valor de $p < 0.05$. **Resultados.** Los jóvenes con obesidad mostraron un aumento significativo de los parámetros antropométricos, clínicos y metabólicos. También se observó una correlación entre el número de CMEc con el número de CEP ($r^* = 0.58$, $p < 0.001$) y kg de masa grasa ($r^* = 0.21$, $p = 0.02$). Los niveles sICAM-1 (302.5 vs 268.9 ng/dL, $p = 0.001$), sE-selectina (91.2 vs 72.8 ng/dL, $p < 0,001$) fueron más elevados en los jóvenes con obesidad y alteraciones metabólicas. La cuenta de CEMc por arriba del tercil superior (≥ 7 células) se relacionó con obesidad, aumento de grasa corporal, niveles de colesterol total, LDL-c y glucosa. En los modelos de asociación la cuenta de CEMc por arriba del segundo tercil (3-6 células) mostró una asociación con: presión alterada (RR=3.5 (IC_{95%}=1.12-10.9) $p = 0.03$), LDL-c ≥ 100 mg/dL (RR=2.54 (IC_{95%}=0.85-7.5) $p = 0.09$) y antecedente familiar de dislipidemia (RR=2.4 (IC_{95%}=0.92-6.2) $p = 0.07$). **Conclusión.** El aumento en el número de CEMc y de los niveles de sICAM-1 y sE-selectina se relacionan con la obesidad y la presencia de alteraciones metabólicas, y pueden ser considerados como marcadores tempranos de disfunción endotelial.

Palabras Clave: Células endoteliales, Disfunción endotelial, Obesidad, Jóvenes.

Abstract:

Obesity promotes endothelial dysfunction causing the detachment of endothelial cells and overexpression of cell adhesion molecules. **Objective.** To evaluate the ratio of the number of circulating endothelial cells and levels of sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin, with traditional cardiovascular risk factors in youth with and without obesity. **Methodology .** We conducted a study involving 119 university students, aged 18 to 28 years: 66 normal weight and 53 obese. They conducted a survey and assessment of body composition and metabolic profile. From a sample of peripheral blood using flow cytometry, we quantified the number of circulating mature endothelial cells (CMEc), defined as; CD146⁺/CD34⁺/CD45⁻ and progenitor cells (EPC), CD34⁺/CD133⁺/CD45⁻. The levels of sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin were determined by ELISA. Statistical analysis was performed using STATA Software v.2. The relationship and association of the number of CEM and outcome measures established by the Spearman correlation coefficient (r^*), and linear regression. Considering a statistical significance value of $p < 0.05$.. Results. Youth with obesity showed a significant increase in the anthropometric, clinical and metabolic. Also noted a correlation between the number of CMEc with CEP number ($r^* = 0.58$, $p < 0.001$) and kg of fat mass ($r^* = 0.21$, $p = 0.02$). sICAM-1 levels (302.5 vs. 268.9 ng/dL, $p = 0.001$), sE-selectin (91.2 vs 72.8 ng/dL, $p < 0.001$) were higher in youth with obesity and metabolic disorders. CEMc account above the upper tertile (≥ 7 cells) was associated with obesity, increased body fat, total cholesterol, LDL-c and glucose. In partnership models CEMc account above the second tertile (3-6 cells) showed an association with: altered pressure (RR=3.5(CI 95%=1.12-10.9), $p = 0.03$), LDL-c ≥ 100 mg/dL (RR=2.54 (CI95% =0.85-7.5) $p = 0.09$) and family history of dyslipidemia (RR=2.4 (CI95%= 0.92-6.2) $p = .07$).. Conclusion. The increase in the number of CMEc and levels of sICAM-1 and sE-selectin associated with obesity and the presence of metabolic, and can be considered as early markers of endothelial dysfunction.

Keywords: endothelial cells, endothelial dysfunction, Obesity, Youth.

Introducción.

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial, que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo en el cuerpo (Lijnen, 2008). En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la obesidad se asocia a un proceso inflamatorio crónico de bajo grado. La inflamación se manifiesta por el aumento de los niveles séricos de Proteína C Reactiva (CRP), que se asocia con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (Police *et al.*, 2009). Algunos estudios han demostrado que los niveles de CRP aumentan notablemente en las personas con obesidad abdominal relacionada con el exceso de tejido adiposo visceral (Mathieu *et al.*, 2009).

Debido a la acumulación de grasa se activan mecanismos que participan en la activación de las vías proinflamatorias JNK e IKK β en el tejido adiposo. Los datos obtenidos en modelos experimentales, indican que el estrés en el retículo endoplásmico es importante para el desarrollo de la inflamación (Klop *et al.*, 2012). Por otra parte, los marcadores sistémicos de estrés oxidativo aumentan con la adiposidad y se ha demostrado que este tipo de estrés celular conduce también a la activación de las vías inflamatorias JNK y NF- κ β , lo que puede favorecer la síntesis de ceramida y la activación de los receptores toll-like por medio de los ácidos grasos saturados (Davel *et al.*, 2011). Se ha observado una relación directa entre el índice de masa corporal y los niveles de CRP, IL-6, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), P-selectina, la molécula de citoadhesión vascular-1 (VCAM-1) y de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Van der Meer, 2002).

La adolescencia es uno de los períodos críticos para el inicio o la persistencia de la obesidad y el desarrollo de sus complicaciones. Aunque los factores genéticos predisponen a su desarrollo, diversos estudios han destacado la importancia de los factores ambientales y de comportamiento; la disminución de la actividad física y un mayor consumo de alimentos, como las principales causas de la elevada prevalencia de obesidad y sus complicaciones cardio-metabólicas (Lavrador *et al.*, 2011).

El tejido adiposo ejerce funciones, entre las que podemos incluir acciones sobre el proceso inflamatorio, ya que secreta una gran cantidad de mediadores proinflamatorios tales como; factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), Interleucina-6 (IL-6), leptina, PAI-1, angiotensinógeno, resistina y CRP (Alexeeff *et al.*, 2011). Éstos pueden contribuir a la resistencia a la insulina, así como al daño vascular y al desarrollo aterosclerótico asociado al síndrome metabólico (Karastergiou *et al.*, 2010). La leptina puede actuar además en la pared vascular, donde puede inducir daño, asociado a la estimulación de la producción de endotelina 1 (ET-1) y de especies reactivas del oxígeno, así como de moléculas de adhesión (Gealekman *et al.*, 2011). Estos efectos pueden ser consecuencia de acciones directas sobre el endotelio, puesto que las células endoteliales (CE) expresan el receptor de leptina (Veillard, 2004), por lo que el estrés oxidativo y la inflamación vascular generado favorece el desarrollo de la placa aterosclerótica (Södergren *et al.*, 2010).

El endotelio es un órgano constituido por una monocapa de células que recubren la pared luminal de los vasos sanguíneos, juega un papel clave en la homeostasis vascular al regular el tono vasomotor, la migración y el crecimiento de las células de la pared vascular, la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, los procesos de hemostasia y el balance fibrinolítico, además de ejercer una barrera selectiva entre los compartimentos extra e intravascular (Pierce *et al.*, 2008; Deanfield *et al.*, 2007).

La presencia de factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes, la obesidad, el envejecimiento, el tabaquismo, etc., alteran las funciones del endotelio vascular (Osmond *et al.*, 2008; Calan *et al.*, 2011), ya que bajo estas condiciones, se pierde el papel homeostático que ejerce el endotelio sobre la función vascular, como consecuencia del desequilibrio entre los factores derivados del endotelio, produciéndose lo que se denomina disfunción endotelial (Gómez-Cerezo *et al.*, 2007). Esta disfunción consiste en la alteración de la función vasomotora caracterizada por una reducida relajación dependiente del endotelio. La disfunción endotelial implica cambios en una o varias funciones vasculares reguladas por los factores endoteliales. Por ello, el concepto de activación endotelial se utiliza en un sentido más amplio para referirse a la sobreexpresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1), a la respuesta

inflamatoria exagerada y a las alteraciones de la agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis, que se observan en situaciones de riesgo cardiovascular (Rohatgi *et al.*, 2009 ;Savoia *et al.*, 2011).

Las CE normales en estado inactivo mantienen la homeostasis, regulando el equilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulantes: por ejemplo produciendo trombomodulina e inhibiendo la formación del factor tisular (FT) para evitar la formación del trombo, además inhibe la inflamación al liberar prostaglandina I₂ (PGI₂) para evitar la adherencia de leucocitos. Pero cuando las células endoteliales son activadas sobreexpresan FT, PAI-1 y moléculas de adhesión como; E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, así como también interleucina-1 (IL-1), por lo que es fundamental la participación del endotelio en la hemostasis vascular y en la trombosis, con mecanismos como la vasoconstricción local, la adhesión y agregación de plaquetas y desencadenamiento de las reacciones que llevan a la formación del coágulo. Cuando la barrera endotelial no está lesionada, impide el contacto entre plaquetas y la matriz extracelular y las CE inhiben la adhesión y agregación plaquetaria, favorecen la actividad fibrinolítica, además de intervenir como anticoagulante (Jelic *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2006; Cesarone *et al.*, 2006).

En la persona sana, el efecto predominante de la activación del endotelio es la vasodilatación, consecuencia de la liberación de NO (óxido nítrico), PGI₂ y del factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF). El endotelio también produce sustancias vasoconstrictoras como ET-1 y la Angiotensina II (Ang II) tisular. La acetilcolina y la trombina tienen acción vasodilatadora cuando la integridad del endotelio está preservada, y vasoconstrictora cuando el endotelio ha desaparecido o está lesionado. Las plaquetas producen tromboxano (TXA₂) y serotonina. El FT juega un papel central, expresado localmente en sitios de lesión vascular o de monocitos circulantes (Svenungsson *et al.*, 2008; Fadini and Avogaro, 2010; Gómez-Cerezo *et al.*, 2007).

Uno de los activadores de las CE es el complejo de ataque a membrana (MAC), quien induce cambios rápidos conformacionales del endotelio que incluyen la formación de grietas intercelulares (gaps), expresión de la molécula de adhesión P-selectina, y activación de proteinasas que liberan heparán-sulfato. El MAC provoca además la regulación río arriba de FT, de COX-2 (ciclooxigenasa-2) y de

quimioquinas. El endotelio es uno de los tejidos genéticamente más estables del organismo, con una velocidad de recambio de varios cientos de días, en condiciones normales se pensaba que las CE se encontraban en estado quiescente (G0), sin embargo cuando las CE sufren lesión mecánica o química induce procesos de reparación. Cuando ocurre angiogénesis o en condiciones patológicas que causan muerte endotelial, las CE proliferarían y llegarían a tener tasas de recambio cercanas a cinco días. Clásicamente, se ha propuesto que la reparación de las zonas en las que existe daño endotelial dependería de la proliferación de CE preexistentes en el tejido vascular, que participarían vía proliferación en la regeneración endotelial. Sin embargo, durante los últimos años se demostró que células derivadas de la médula ósea mediante la vía de señalización PI3-K/Akt podrían incorporarse en los vasos sanguíneos y diferenciarse por acción del VEGF-1 y 2 (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular 1 y 2) provocando la maduración y diferenciación de las CE y por tanto la reorganización citoesquelética y la motilidad celular (Goon *et al.*, 2006; Hagensen *et al.*, 2012; Zachary y Gliki, 2001; Dikov *et al.*, 2005).

La disfunción endotelial es uno de los primeros cambios que sufren las arterias cuando se presenta una lesión endotelial (Onat *et al.*, 2011). En algunas patologías graves como el cáncer o afecciones cardíacas el número de CE maduras circulantes (CEMc) en sangre periférica ha sido considerado marcador pronóstico de metástasis o de severidad de daño endotelial. Un estudio realizado por G. Fürstenberger *et al.*, 2005, demostró en pacientes con cáncer una mediana de $3.3 \text{ CEM}/\mu\text{L}^{-1}$ vs $1.0 \text{ CEM}/\mu\text{L}^{-1}$ en los pacientes control, por otra parte Wideman *et al.*, 2008, determinaron una cuenta promedio de $5 \text{ CEM}/\text{mL}^{-1}$ en personas sanas, mientras que en pacientes con angioplastia coronaria la cuenta alcanzó un promedio de $26.5 \text{ CEM}/\text{mL}^{-1}$ y en pacientes con trasplante renal de $39 \text{ CEM}/\text{mL}^{-1}$, (Alexeeff *et al.*, 2011).

Cuando hay disfunción endotelial, la permeabilidad vascular aumentada causa un incremento en el ingreso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio de la íntima arterial, rebasando al sistema de transporte inverso del colesterol para regresar la LDL al torrente sanguíneo. En el mecanismo de la aterogénesis, la retención de las lipoproteínas es consecuencia de las interacciones que se

establecen con los componentes de la matriz extracelular (MEC). La asociación LDL-MEC temporal o permanente es un importante contribuyente para su depósito durante la aterogénesis, pues favorece modificaciones estructurales, hidrolíticas y oxidativas de las lipoproteínas, incrementando su tasa de fagocitosis por macrófagos y la formación de células espumosas. Por otra parte, además de la incapacidad del transporte inverso del colesterol para devolver a la sangre el colesterol asociado a LDL, condiciones como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y el hábito tabáquico reducen las concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), disminuyendo aún más la eliminación de LDL. Este proceso puede acentuarse en pacientes con DM2 debido a la glicosilación de las lipoproteínas LDL, que reduce el reconocimiento de éstas lipoproteínas por sus receptores, lo que disminuye a su vez su eliminación. Como resultado las LDL permanecerán más tiempo en el espacio subendotelial, donde se oxidarán a un grado mínimo, lo que las convierte en LDL mínimamente modificables (MM-LDL) (Herder *et al.*, 2011; Tilg y Moschen, 2006; Bekkers *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por George *et al.*, en 2004, se mostró un aumento del número de células progenitoras endoteliales (EPCs) en pacientes con angina de pecho inestable, en comparación con pacientes con angina de pecho estable, donde 7 pacientes con angina de pecho inestable que fueron seguidos por 3 meses después de la estabilización clínica, presentaron una reducción cercana al 50% del número de EPCs en circulación.

En otro estudio realizado por Cesarone *et al.*, en 2006, en un grupo de pacientes con insuficiencia venosa crónica, se encontró elevado el número de EPCs en circulación y cuando fueron sometidos a un tratamiento por 4 semanas con el fármaco Venoruton® (Troxeutina), el número de EPCs disminuyó en más de un 50%.

Pocos estudios han relacionado el número de células endoteliales maduras y progenitoras y enfermedad isquémica cardíaca, sin embargo estos no han sido evaluados desde el enfoque de marcadores tempranos de disfunción o daño vascular en población joven con obesidad, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la relación del número de CEMc y CEP y de los niveles de sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina, con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales

en jóvenes con obesidad y normopeso, y poder establecer una relación entre ellos que determine la presencia no sólo de activación sino también de daño endotelial.

Material y métodos:

Se evaluó una población de 119 jóvenes de ambos géneros con edades entre 18-28 años, seleccionando 66 jóvenes con normopeso y 53 con obesidad, todos estudiantes de las Unidades Académicas de Ciudad Universitaria de la UAGro.

Mediciones somatométricas y aplicación de la encuesta:

Se sensibilizó a los jóvenes sobre la importancia de su participación en el estudio, dándoles a conocer los procedimientos a los que serían sometidos y los lineamientos éticos que rigieron la investigación. Los jóvenes universitarios que accedieron a participar en el estudio y cumplieron con los criterios de inclusión, firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1), se realizaron las mediciones somatométricas; presión arterial sanguínea mediante un baumanómetro automatizado de la marca OMROM HEM 712C. El peso, IMC, masa y porcentaje de grasa, y masa magra por impedancia bioeléctrica empleando la báscula de precisión TANITA TBF-300, y la talla, circunferencia de cintura y cadera se determinaron empleando un estadímetro portátil de la marca SECA, seguido por la aplicación de una encuesta (Anexo 2) para la obtención de datos socioeconómicos, de estilo de vida, antecedentes familiares e historial clínico.

Toma de la muestra sanguínea:

A todos los jóvenes, con un ayuno previo de 8 horas, mediante venopunción se les tomó una muestra sanguínea, se utilizó 1 tubo al vacío sin anticoagulante para la obtención de suero, para realizar el perfil bioquímico y la cuantificación de marcadores de activación endotelial (sICAM, sVCAM y sE-selectina) y otro tubo con anticoagulante para la detección de células endoteliales en circulación. La muestra para la determinación del perfil bioquímico fue primeramente tomada como una medida de mitigar la obtención de células endoteliales desprendidas durante el proceso de venopunción.

Determinación del perfil bioquímico:

La muestra obtenida sin anticoagulante fue centrifugada a 2500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. La separación del suero se realizó utilizando pipetas automáticas, eliminando las muestras sanguíneas hemolizadas o insuficientes.

El análisis del suero para el perfil bioquímico (colesterol, HDL-c, LDL-c, triglicéridos, glucosa) fue realizado por ensayo colorimétrico empleando reactivos de la marca SPINREACT, en el equipo semiautomatizado SPINREACT (SPINLAB).

Cuantificación de marcadores inmunológicos:

A partir de la misma muestra de suero fueron cuantificados por el método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) los marcadores de activación endotelial sICAM, sVCAM y sE-selectina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Kit ELISA eBioscience para sICAM, sVCAM y sE-selectina) (Anexo 8).

Cuantificación de las células endoteliales en circulación:

La cuantificación de las células endoteliales progenitoras y maduras en circulación fue realizada a partir del tubo con EDTA, mediante el análisis de sangre total, utilizando anticuerpos marcados específicamente, por el método de citometría de flujo (BD FasciCanton II) las CEMc fueron definidas como células CD146⁺/CD34⁺/CD45⁻ y las CEP como CD34⁺/CD133⁺/CD45⁻ (Anexo 9).

Consideraciones éticas y de bioseguridad:

El proyecto fue realizado bajo los principios y lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki, Corea 2008. El consentimiento informado fue otorgado por escrito por cada participante. Los resultados de las mediciones somatométricas y bioquímicas fueron entregados en un formato de reporte especial a cada participante. Todos los RPBI se trataron de acuerdo a la NOM-87-ECOL-SSA1-2002, la cual establece los requisitos para la separación,

envasado, almacenamiento, recolección, transporte y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Análisis estadístico:

El análisis de los resultados se realizó con el paquete estadístico STATA v 9.2. Se obtuvieron medias y desviaciones estándar para las variables cuantitativas simétricas y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de t-student y ANOVA, y para las variables cuantitativas no simétricas se obtuvieron mediana y rangos intercuartilo (percentiles 5 y 95), realizando la comparación entre grupos mediante la prueba de Mann Whitney o Kruskal Wallis, las correlaciones entre variables cuantitativas se establecieron mediante correlación de Spearman, y las asociaciones mediante modelos de regresión logística simple y multivariados.

Resultados

Este estudio se realizó en una población de 119 jóvenes universitarios (44 hombres/75 mujeres) con edades entre 18 y 28 años, 66 de ellos con normopeso y 53 con obesidad.

Los valores de las mediciones antropométricas, clínicas y metabólicas fueron mayores en el grupo de jóvenes con obesidad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características antropométricas, clínicas y metabólicas de la población sujeta a estudio.

Variables	Total n=119	Normopeso n=66	Obesos n=53	Valor de p
Peso (kg)	66.2 (47.4-106.7)	57.5 (45.7-69.5)	90.1 (66.5-117.7)	<0.001
Talla (m)	161 (149-177)	159.5 (149-176)	162 (148-179)	0.47
IMC (kg/m ²)	24.3 (19.5-38.8)	21.8 (19.1-24.5)	33.2 (30-41.3)	<0.001
Cintura (cm)	87 (70-119)	78.9 (69-88.3)	106.9 (93-122.5)	<0.001
Cadera (cm)	99 (85-119.5)	93.7(84.5-100)	113.1 (100-124.5)	<0.001
Brazo (cm)	29.1 (23.4-38.5)	27 (23-31.1)	35.5 (32-40.6)	<0.001
Masa grasa (kg)	16.8 (6.1-44.3)	10.6 (6.1-18.3)	32.7 (21.1-48.6)	<0.001
% grasa	27.4 (11.4-45.1)	19.6 (10-29.4)	36.9 (27.5-47.1)	<0.001
Masa magra (kg)	48.3 (38.6-72.4)	42.8 (38.3-59.3)	52.5 (43.6-78.4)	<0.001
TAS (mmHg)	106 (90-127)	100 (88-114)	115 (102-129)	<0.001
TAD (mmHg)	67 (50-90)	63 (49-95)	71.5 (62-90)	<0.001
Glucosa (mg/dl)	80 (68-101)	80 (69-90)	82.5 (68-115)	0.015
Colesterol (mg/dl)	150.5 (106-227)	143 (101-198)	169.5 (122-236)	<0.001
Triglicéridos (mg/dl)	92 (47-197)	75.5 (43-153)	122.5 (72-208)	<0.001
LDL-c (mg/dl)	113 (52-196)	102.5 (52-149)	123.5 (61-212)	<0.001
HDL-c (mg/dl)	45.5 (32-68)	47 (36-68)	44 (32-65)	0.052

Los valores presentados son: mediana y percentiles 5 y 95 para variables no paramétricas. Valores de p obtenidos mediante prueba X^2 , y prueba de Mann Whitney, con un valor de significancia estadística <0.05.

Para cuantificar el número de células endoteliales en circulación, se realizó la técnica de citometría de flujo a partir de una muestra de sangre total, de cada participante en el estudio, utilizando los siguientes marcadores, para las CEMc (CD45-PerCP⁻, CD34-FITC⁺ y CD146-PE⁺) (figura 1A-1C) y la cuantificación de la población celular (figura 1D).

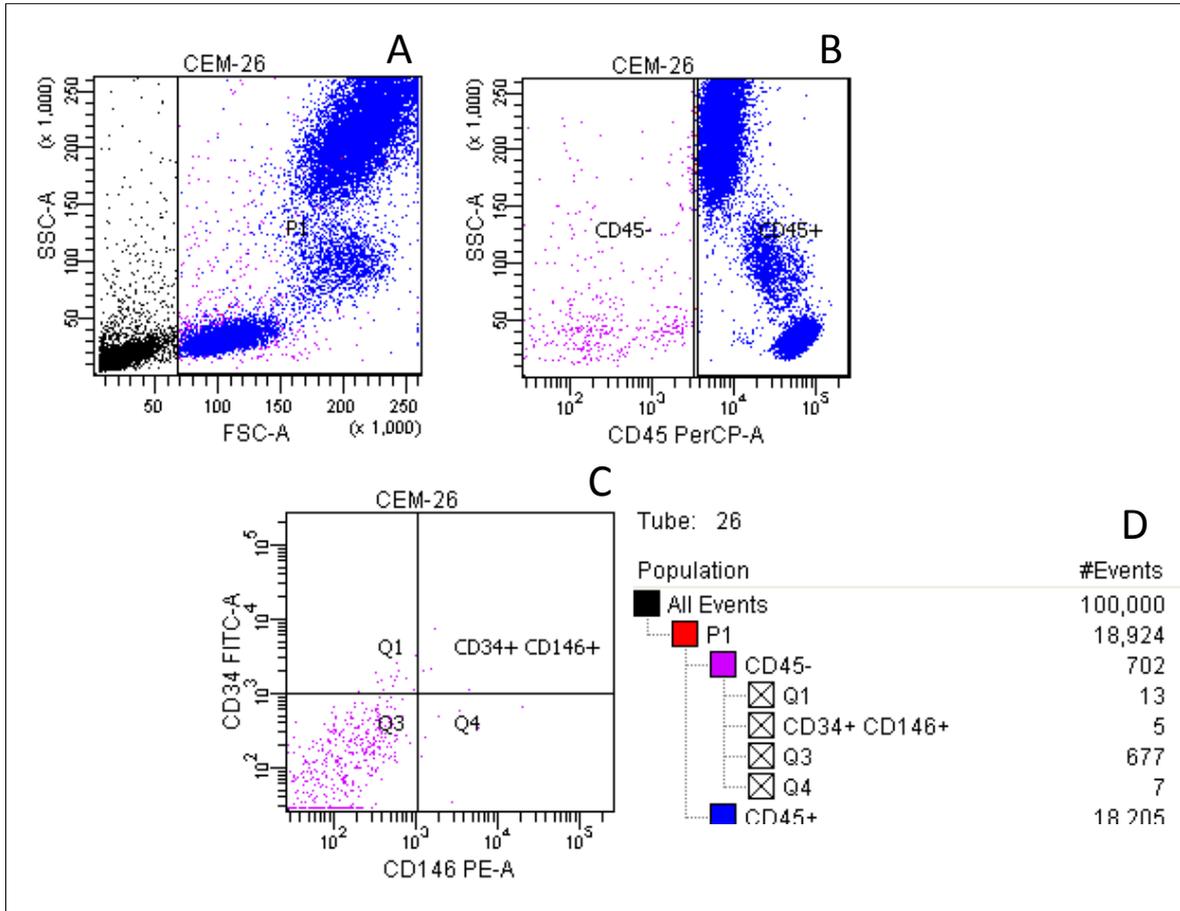


Figura 1. Cuantificación de las CEM en circulación. En el histograma 1A se observa la caracterización de las células sanguíneas de acuerdo al tamaño (FSC) en el eje de las "X" y complejidad (SSC) en el eje de las "Y". En el histograma 1B muestra en el eje de las "X" CD45-PerCP y en el eje de las "Y" SSC, de acuerdo a estos parámetros se seleccionaron las dos regiones azul CD45+ y morada CD45-. En el histograma 1C se utiliza la población CD45- del histograma 1B para mostrar el doble marcaje positivo que muestra en el eje de las "X" CD146-PE y en el eje de las "Y" CD34+, característico para CEM.

Para la cuantificación de las CEP se utilizaron los marcadores (CD45-PerCP⁻, CD34-FITC⁺ y CD133-PE⁺) (figura 2A-2C), llevando a cabo la cuantificación de la población celular de interés (figura 2D).

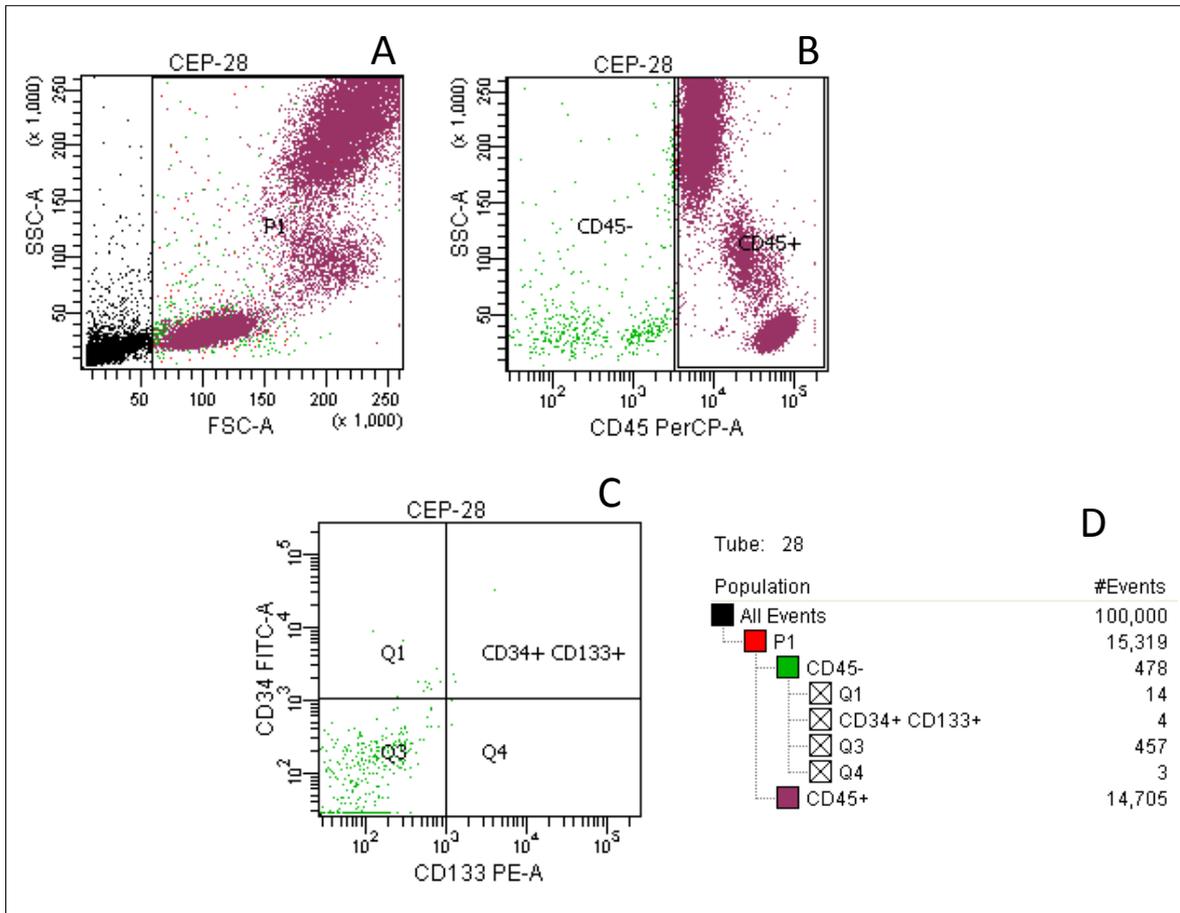


Figura 2. Cuantificación de las CEP en circulación. En la histograma 1A se observa la caracterización de las células sanguíneas de acuerdo al tamaño (FSC) en el eje de las "X" y complejidad (SSC) en el eje de las "Y". En el histograma 1B muestra en el eje de las "X" CD45-PerCP y en el eje de las "Y" SSC, de acuerdo a estos parámetros se seleccionaron las dos regiones guinda CD45+ y verde CD45-. En el histograma 1C se utilizó para definir la población CD45- del histograma e identificar el doble marcaje positivo que muestra en el eje de las "X" CD133-PE y en el eje de las "Y" CD34+, característico de CEP.

En ambos grupos de estudio se determinó el número de CEM, encontrando en el grupo de jóvenes con obesidad, una tendencia al aumento del número de células endoteliales maduras circulantes (figura 3A), sin embargo para las CEP no se mostró una asociación (figura 3B), sin embargo en el grupo de jóvenes con obesidad el rango fue mayor.

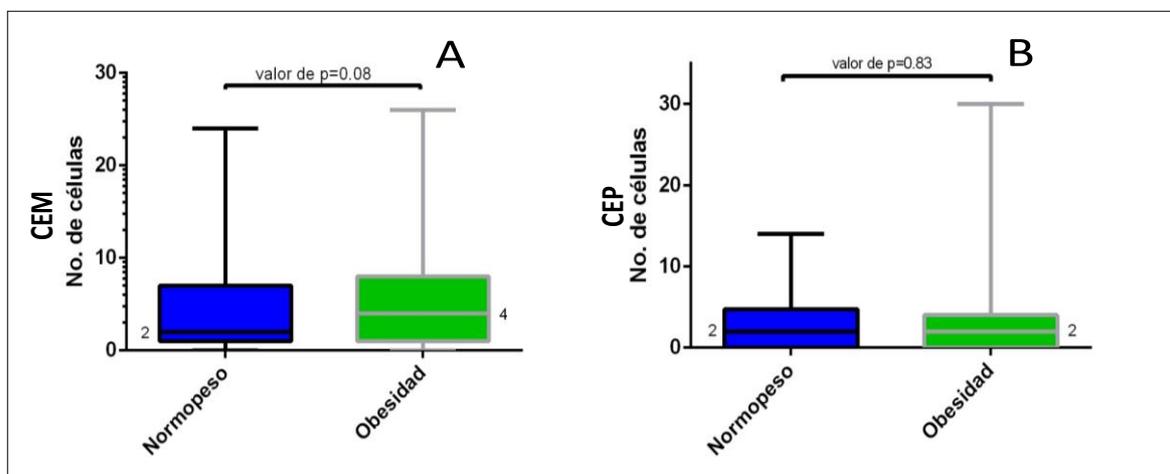


Figura 3. Células Endoteliales Maduras y Progenitoras por grupo de estudio. En la figura 3A se muestran las medianas de las CEM para normopeso (2 CEM) y para obesidad (4 CEM), con un valor de $p=0.08$ y para las CEP las medianas fueron 2 CEP en ambos grupos.

Para determinar la relación entre el número de CEMc, CEP y los parámetros antropométricos, clínicos y metabólicos, se realizó el análisis de la correlación lineal, encontrando una correlación positiva y significativa entre las CEM y la masa grasa, porcentaje de grasa y CEP, mientras que las CEP sólo mostraron correlación positiva con la masa magra, aunque no de manera significativa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Correlación entre el número de células endoteliales progenitoras con parámetros metabólicos y antropométricos.

Variable	CEM		CEP	
	r^*	Valor p	r^*	Valor p
CEP	0.58	<0.001	-	-
TAS	0.06	0.49	-0.001	0.99
TAD	0.05	0.55	-0.02	0.75
IMC	0.11	0.21	0.07	0.42
Masa grasa (kg)	0.21	0.02	0.09	0.30
% Grasa	0.16	0.08	0.02	0.79
Masa magra (kg)	-0.001	0.98	0.16	0.09
Glucosa-c (mg/dL)	0.13	0.15	0.03	0.68
LDL-c	0.09	0.30	-0.08	0.37
HDL-c	0.10	0.26	0.01	0.85

r^* = Rho, coeficiente de correlación de Spearman

Además, en este estudio se determinó la asociación entre el número de CEM con las diferentes medidas antropométricas, clínicas y metabólicas, para lo cual se estratificó el número de CEM por terciles, encontrando que los jóvenes con CEMc

por arriba del tercer tercil, mostraban significativamente mayor masa grasa, porcentaje de grasa, colesterol, LDL-c, CEP, así de glucosa, aunque no de manera significativa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características antropométricas, clínicas y metabólicas de acuerdo a CEM en terciles.

Variables	1° Tercil ≤2 células	2° Tercil 3-6 células	3° Tercil ≥ 7 células	Valor de <i>p</i>
Peso (kg)	63.3 (45.7-117)	66.8 (49.1-102.7)	73.3 (46.8-106.7)	0.44
IMC (kg/m ²)	23.3 (19.8-40.8)	28.8 (20-36.8)	30.2 (19-38.8)	0.28
Cintura (cm)	83 (69-122.5)	90.5 (77-115.5)	98.1 (73-119)	0.28
Cadera (cm)	97 (87-119)	100 (88-124)	102.5 (84-121.2)	0.15
Brazo (cm)	27.75 (24-38)	31 (24-36.7)	29.5 (23-40.6)	0.24
Masa grasa (kg)	14 (6.1-44.3)	22.5 (8.1-44)	24.45 (5.8-45.8)	0.026
% grasa	24.8 (10.8-45.8)	29.65 (13.6-44.0)	28.75 (10-46.6)	0.046
Masa magra (kg)	50.4 (38.7-73.6)	47 (39.2-65.4)	47.95 (37.2-74.6)	0.81
TAS (mmHg)	105 (68-120)	110.5 (90-127)	107 (92-129)	0.22
TAD (mmHg)	65 (50-96)	71.5 (50-90)	67 (52-83)	0.15
Glucosa (mg/dL)	78 (71-94)	83 (66-101)	82 (67-115)	0.078
Colesterol (mg/dL)	146 (101-223)	169 (103-227)	149.5 (117-236)	0.03
Triglicéridos (mg/dL)	83 (44-189)	105 (48-205)	96.5 (47-208)	0.20
LDL-c (mg/dL)	105 (47-198)	139 (52-173)	111.5 (70-217)	0.016
HDL-c (mg/dL)	44 (31-62)	46 (36-71)	46 (33-65)	0.31
CEP (n)	1 (0-6)	2 (0-7)	5 (0-16)	<0.001

Los valores presentados son: mediana y percentiles 5 y 95 para variables no paramétricas. Valores de *p* mediante prueba X^2 , y test de Mann Whitney, con un valor de *p* <0.05.

En base a las relaciones mostradas en el cuadro 3, los parámetros metabólicos se estratificaron cualitativamente de acuerdo a los valores descritos por el ATPIII, encontrando una asociación (riesgo relativo, RR) entre el segundo y tercer tercil de CEMc y la presencia de obesidad así como con la presión alterada, niveles de LDL-c ≥ 100 mg/dL y antecedentes familiares de dislipidemia (Cuadro 4).

Cuadro 4. Riesgos Relativos de factores de riesgo cardiovasculares de acuerdo a CEM por terciles.

Factores de riesgo cardiovascular	CEM (terciles)		
	RR (IC95%), valor de p		
	*1° Tercil ≤2 células	2° Tercil 3-6 células	3° Tercil ≥ 7 células
Obesidad	1	2.2 (0.89-5.5)0.087 &1.90 (0.70-5.1)0.20	2.17 (0.91-5.1)0.08 &2.8(1.08-7.2) 0.03
Obesidad abdominal	1	1.56(0.62-3.9)0.33 &1.26(0.48-3.2)0.6	2.0(0.84-4.7)0.11 &2.16(0.87-5.3)0.09
Presión alterada	1	3.55(1.19-10.6) 0.02 &3.5(1.12-10.9) 0.03	1.53(0.48-4.8)0.46 &1.78(0.54-5.9)0.34
Glucosa ≥100 mg/dL	1	1.88(0.25-14.1)0.53 &1.72(0.22-13.5)0.60	2.31(0.36-14.6)0.37 &2.63(0.40-17.1)0.30
Colesterol≥200 mg/dL	1	2.49(0.74-8.3)0.13 &2.17(0.63-7.5)0.21	0.71(0.16-3.05)0.64 &0.72(0.16-3.1)0.67
Triglicéridos≥150 mg/dL	1	2.5(0.80-7.81)0.11 &2.5(0.73-8.6)0.14	1.31(0.40-4.3)0.65 &1.70(0.47-6.0)0.41
LDL-c ≥100 mg/dL	1	2.93(1.02-8.4) 0.04 &2.54(0.85-7.5)0.09	1.53(0.63-3.4)0.34 &1.65(0.66-4.1)0.27
HDL-c ≤40 mg/dL	1	0.56(0.20-1.57)0.27 &0.66(0.23-1.91)0.45	0.6(0.23-1.52)0.28 &0.55(0.21-1.45)0.23
Antecedentes de ECV	1	0.80 (0.26-2.4)0.69 &0.88(0.28-2.69)0.82	0.87(0.32-2.4)0.80 &0.86(0.31-2.36)0.77
Antecedentes de Obesidad	1	2.3(0.88-5.9)0.08 &2.06(0.76-5.6)0.15	1.29(0.55-3.03)0.54 &1.46(0.6-3.5)0.40
Antecedentes de hipertensión	1	1.23(0.49-3.0)0.64 &1.12(0.43-2.8)0.80	0.86(0.35-2.0)0.73 &0.83(0.34-2.0)0.69
Antecedentes de dislipidemia	1	2.75 (1.08-6.9) 0.03 &2.40(0.92-6.2)0.07	1.38(0.58-3.32)0.46 &1.38(0.56-3.4)0.47

*Categoría de referencia, [®] RR ajustado por edad y género.

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar en ambos grupos los niveles séricos de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina. El grupo de jóvenes con obesidad mostraron mayores niveles de ICAM-1 (302.5 ng/dL vs 268.9 ng/dL) $p=0.001$ y E-selectina (91.2 ng/dL vs 72.8 ng/dL) $p<0.001$ en comparación con el grupo de normopeso, sin embargo para los niveles de sVCAM-1 no se observaron diferencias significativas (649.9 ng/dL vs 673.6 ng/dL) $p=0.83$ (Figura 4). En la figura 5 se muestra la dispersión de los valores obtenidos de cada molécula de adhesión de acuerdo al grupo de estudio.

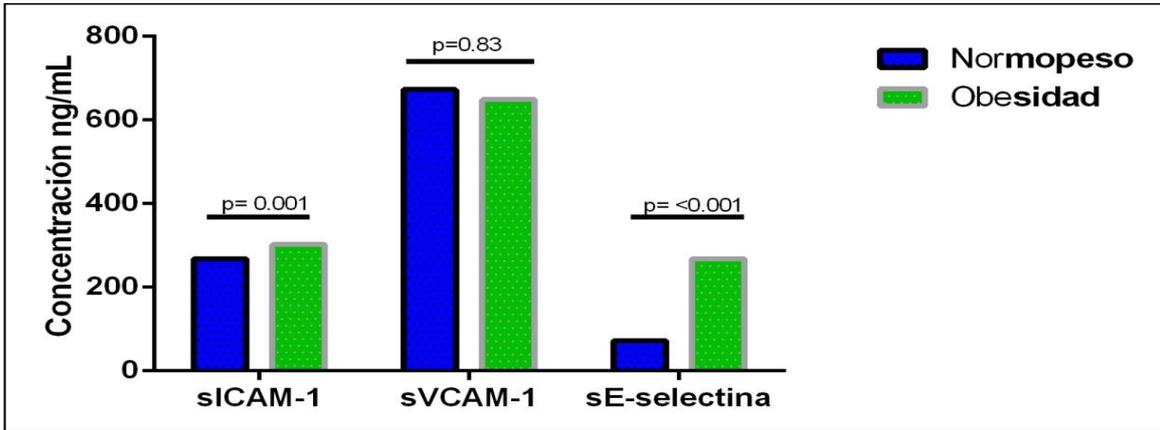


Figura 4. Moléculas de adhesión por grupo de estudio.

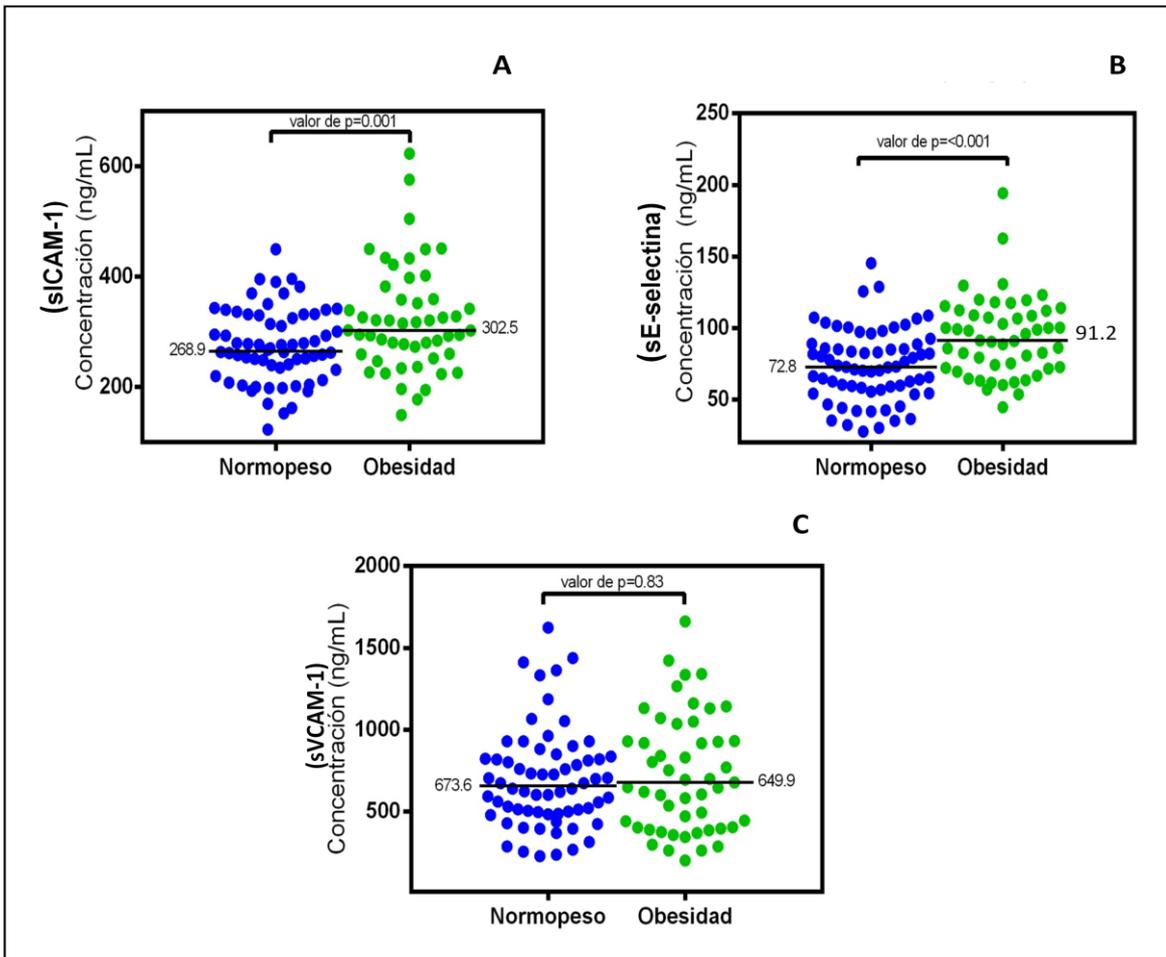


Figura 5. Concentraciones de las tres moléculas de adhesión por grupo de estudio. En la figura 5A se observa la dispersión de las concentraciones de sICAM-1 entre grupos, con un valor de $p=0.001$, en la figura 5B las concentraciones de sE-selectina con un valor de $p < 0.001$ y en la figura 5C las concentraciones de sVCAM-1 con un valor de $p=0.83$.

Para determinar la asociación entre los niveles solubles de las moléculas de adhesión y la alteración de los parámetros metabólicos, se realizó la comparación

de acuerdo a los parámetros considerados componentes del síndrome metabólico, observando que los niveles de sICAM-1 se relacionaron significativamente con la presencia de colesterol, LDL-c alterados, y obesidad abdominal, la cual también mostró una tendencia a la asociación con el incremento en los niveles de sE-selectina. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Niveles de moléculas de adhesión de acuerdo a algunas alteraciones clínicas y metabólicas.

Variable	sICAM-1	sVCAM-1	sE-selectina
Glucosa			
<100 mg/dL	280.6 (162.1-449.6)	649.9 (268.4-1422.4)	80.4(36.3-125.5)
≥100 mg/dL	295.1(208.0-433.1)	753.7(255.8-1265.7)	100.0(53.7-194.1)
<i>p</i>	0.98	0.51	0.18
Colesterol			
<200 mg/dL	279.0(157.3-411.9)	661.8(263.2-1416.8)	80.2(41.6-119.8)
≥200 mg/dL	330(225-6223.2)	704.9(297.8-2557.7)	88.6(30.4-194.2)
<i>p</i>	0.03	0.70	0.17
Triglicéridos			
<150 mg/dL	278.4(152.4-449.6)	673.6 (263.2-1437.4)	80.8(36.4-119.8)
≥150 mg/dL	320.9(227.0—451.1)	604.9(297.8-1130.0)	82.7(56.8-145.4)
<i>P</i>	0.06	0.34	0.25
LDL-c			
<100 mg/dL	255.3(157.3-425.8)	700 (329.3-1387.0)	79.2(41.6-118)
≥100 mg/dL	294.9(177.8-451.2)	640.3(255.8-1623.9)	82.6(36.4-129.6)
<i>p</i>	0.01	0.35	0.27
HDL-c			
>40 mg/dL	227(152.4-449.6)	673.6(287.3-1422.5)	75.8(35.4-129.6)
≤40 mg/dL	284.1(196.4-449.6)	620.6(263.2-1336.6)	84.9(42.0-119.8)
<i>P</i>	0.43	0.53	0.25
Obesidad abdominal			
No	270(152.4-434.3)	673.6(288.3-1411.3)	78.5 (35.4-125.6)
Si	294.9(194.7-451.1)	664.6(263.2-1422.5)	86.0(45.2-130.6)
<i>p</i>	0.05	0.87	0.06
Presión arterial			
Normotenso	280.1(152.4-449.6)	673.6(268.4-1438.4)	80.2(36.4-128.8)
Prehipertenso	277.1(225-504.9)	663.0(202.4-1336.6)	94.7(53.7-119.8)
Hipertenso	343.3(193.3-433.1)	696.1 (315.7-1265.7)	81.8(30.4-194.2)
<i>p</i>	0.47	0.94	0.21

Los valores presentados son: mediana y percentiles 5 y 95 para variables no paramétricas. Valores de *p* mediante prueba de Mann Whitney y Kruskal Wallis, con un valor de *p* <0.05.

En el cuadro 6, se muestran los niveles de moléculas de adhesión en relación con el número de parámetros alterados, observando que a mayor número de parámetros los niveles de sICAM-1 son significativamente mayores, así como también los de sE-selectina, aunque sin alcanzar un valor significativo.

Cuadro 6. Niveles de moléculas de adhesión de acuerdo al número de parámetros.

No. de parámetros	sICAM-1	sVCAM-1	sE-selectina
Ninguno	223.8 (152.4-399.1)	623.8(404.7-1411.3)	72.0(35.2-108.7)
1	227.8(123.2-449.6)	728.1(237.6-1661.3)	73.0(36.3-130.6)
2	293.3(208.0-421.7)	620.6(263.2-1623.9)	85.8(45.2-125.5)
3	320.9(193.3-623.3)	646.8(263.2-1336.6)	88.6(30.3-129.6)
4	260.1(225-433)	547.3(202.4-1265.7)	97.9(61.7-194.1)
Valor P	0.006	0.87	0.08

Los valores presentados son: mediana y percentiles 5 y 95 para variables no paramétricas. Valores de p , mediante la prueba de Kruskal Wallis, con un valor de $p < 0.05$.

Discusión

En este estudio, observamos que los jóvenes con obesidad presentan un número mayor de alteraciones metabólicas, en comparación con los de normopeso, destacando las dislipidemias, hiperglucemia, hipertensión; estos resultados coinciden con un estudio realizado por Lavrador *et al.*, 2010, en una población joven en donde encontraron significativamente mayor hiperglucemia ($p=0.001$), niveles de HDL-c ($p=0.020$), triglicéridos ($p=0.013$) y prevalencia de hipertensión ($p=0.024$) en el grupo de jóvenes con obesidad; por lo que la obesidad se ha definido como un factor de riesgo para la presencia clara de alteraciones metabólicas que podrían favorecer la disfunción endotelial y con ello un posible desprendimiento de las CEM ocasionando una lesión vascular (Cesarone *et al.*, 2006).

El marcaje que se utilizó para la identificación y diferenciación de las CEMc y CEP, fue CD45⁻ para ambas células, con este marcador se descartaron células hematopoyéticas, las cuales son CD45⁺ (Mariucci *et al.*, 2010; Strijbos *et al.*, 2008). El CD34⁺ fue empleado debido a que las células endoteliales en su superficie expresan gran cantidad de estos receptores, facilitando su detección (Steurer *et al.*, 2008; Mariucci *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2006). Para diferenciar entre células progenitoras y maduras, se decidió utilizar para identificar las CEP el marcador CD133⁺, el cual sólo lo presentan las endoteliales progenitoras o células endoteliales inmaduras (Peichev *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2010). Por último, para la diferenciación de las CEMc se utilizó el marcador CD146⁺ característico de estas células maduras y diferenciadas, listas para cumplir las necesidades de remodelamiento del endotelio vascular (Abdelmoneim *et al.*, 2010; Goon *et al.*, 2006; Fürstenberger *et al.*, 2005; Steurer *et al.*, 2008).

En un estudio que realizaron Boos *et al.*, 2007, en pacientes con síndrome coronario agudo, cuantificaron el número de CEMc en circulación, demostrando que existe una correlación positiva y significativa entre el incremento de las CEMc y el aumento de riesgo cardiovascular. La disminución del número de CEP ha sido reportado como un evento que predice y favorece el riesgo de futuros eventos cardiovasculares en personas con alguna patología cardíaca, estos niveles disminuidos también se asocian con rigidez arterial. En contraste, el aumento de

estas células ha sido asociado con la supervivencia de los pacientes con síndrome coronario, ya que se consideran un buen marcador pronóstico de personas con lesión vascular, reducen el riesgo de eventos cardiovasculares, mejora la vascularización, favorece la disminución de la intima y la formación de la monocapa endotelial, por lo tanto reduce la incidencia de estenosis (Cesarone *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008). En el presente trabajo se cuantificó el número de células endoteliales maduras y progenitoras en personas jóvenes sin sintomatología ni diagnóstico de enfermedad cardíaca, observando que en el grupo de jóvenes con obesidad presentó un ligero aumento del número de CEMc aunque sin alcanzar la significancia estadística, en comparación con los jóvenes con normopeso. Al realizar la correlación del número de CEMc con parámetros metabólicos y antropométricos, observamos una alta correlación positiva con el número de CEP, lo cual podría sugerir un mecanismo compensatorio entre la pérdida de CEMc y la necesidad de regeneración endotelial, por otra parte la relación observada entre las CEP y la masa magra podría explicarse por lo descrito por Hagensen *et al.*, 2012; Jelic *et al.*, 2009 quienes han reportado que el aumento de CEP se asocia con un menor riesgo cardiovascular, lo que explicaría que jóvenes con mayor masa magra cuenten con un mayor número de CEP, lo que les conferiría un menor riesgo de ECV.

Al realizar la estratificación de la cuenta de las células endoteliales maduras por terciles se encontró una relación entre el tercil superior y mayor masa grasa, porcentaje de grasa, colesterol, LDL-c y CEP. De acuerdo a estos valores se considera que los niveles elevados de lípidos en circulación favorecen el desarrollo de disfunción endotelial, a causa de la disminución del NO, permeabilidad del endotelio, oxidación de los lípidos y producción de citocinas proinflamatorias, lo que puede llevar al desarrollo de lesiones endoteliales reflejado por un mayor desprendimiento de las mismas, sin embargo la alta correlación de las CEM con las CEP circulantes puede reflejar el mecanismo de reparación que es activado a causa del daño endotelial (Jelic *et al.*, 2009; Zampetaki *et al.*, 2008).

En este estudio se observó que los jóvenes que presentan obesidad, tienen un número de células endoteliales maduras en circulación por arriba de 7, de igual forma los jóvenes que presentan niveles elevados de LDL-c y presión arterial

elevada presentan de 3 a 6 células endoteliales maduras en circulación, la presión arterial ha sido reportada como un factor que favorece la descamación del endotelio y la disfunción por el estrés de rose (Fadini *et al.*, 2010; Goon *et al.*, 2006). Mientras que algunos reportan como normal la ausencia de células endoteliales maduras en circulación, otros han referido, una cuenta promedio de 5 CEM/ mL⁻¹ (Wideman *et al.*, 2008), mientras que en pacientes con angioplastia coronaria la cuenta reportada ha alcanzado cifras hasta de 26.5 CEM/mL⁻¹. Las asociaciones entre el número de células y alteraciones metabólicas en este estudio reflejan la ocurrencia temprana de daño vascular en población joven a causa de la presencia de alteraciones metabólicas, lo que incrementa significativamente el riesgo cardiovascular.

Con respecto a la determinación de los niveles séricos de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en ambos grupos de estudio, se encontró que los jóvenes obesos muestran mayores niveles solubles de sICAM-1 y sE-selectina en comparación con el grupo de normopeso. Realizando la asociación entre los niveles solubles de las moléculas de adhesión en relación con la alteración de los parámetros metabólicos, se obtuvo una relación entre el incremento de los niveles en sICAM-1 con colesterol, LDL-c y obesidad abdominal. También observamos que al incrementarse el número de parámetros metabólicos se incremento de los niveles de sICAM-1, resultados similares fueron reportados en un estudio llevado a cabo por Chong *et al.*, 2006, en el que encontraron que los niveles de sE-selectina se incrementan de manera significativa en pacientes con insuficiencia cardiaca (67 ng/mL); así como también Wong *et al.*, 2006, refiere un aumento significativo del nivel de sICAM-1 (144 ng/mL) en pacientes con aterosclerosis, los niveles observados en nuestro estudio son similares aunque mayores a los reportados en pacientes con alteración coronaria, por lo que el daño al endotelio vascular en la población joven con obesidad es sugerente.

El endotelio vascular desarrolla y expresa moléculas que inician la migración local de leucocitos. sICAM-1 puede ser liberada por el tejido dañado o inflamado, como consecuencia de proteólisis, por acción de las metaloproteasa 2 y 9, que es son gelatinasas que actúan sobre la elastina y los colágenos tipo IV, V, VII y X, el dominio catalítico contiene el lugar activo que se unirá a Zn²⁺ y Ca²⁺ para llevar a

término su acción y así poder desprender las moléculas del endotelio vascular y ser séricas (Devaraj y Jialal, 2012; Slavik *et al.*, 2011). Esta observación podría explicar los valores elevados de sICAM-1 en los pacientes con obesidad de este estudio, ya que la sE-selectina facilita la fase temprana de adhesión de los polimorfonucleares a la célula endotelial por medio de sus receptores, constituyendo un marcador sérico temprano de la respuesta inflamatoria y promoviendo el daño celular. Con respecto a lo anterior se sugiere que ya que se han encontrado elevados los niveles de estas moléculas en cardiopatías los presentes resultados ponen de manifiesto la existencia de valores elevados de ICAM-1 y E-selectina soluble en los jóvenes con obesidad aparentemente sanos, lo que nos indica el inicio de la activación endotelial y el mayor riesgo de presentar de manera temprana eventos cardiovasculares.

Sin embargo, el patrón de sVCAM-1 durante las mediciones fue diferente del patrón anteriormente descrito para las moléculas sICAM-1 y sE-selectina, ya que no reveló diferencias significativas, comparado con los valores del grupo de jóvenes con normopeso, a pesar de la persistencia de los valores incrementados de sICAM-1 y sE-selectina, lo cual podría atribuirse a que sVCAM-1 se expresa de manera constitutiva en el endotelio y el estímulo de las citocinas proinflamatorias no tiene suficiente efecto sobre ésta (Lee y Imhof, 2008).

Si bien la edad, el género y grupo étnico son reconocidos en la bibliografía como factores de riesgo no modificables de enfermedad cardiovascular, la tarea médica debe enfocarse a prevenir y/o corregir en los jóvenes, los factores de riesgo modificables como obesidad, sedentarismo, alcoholismo, tabaquismo, hipertensión arterial, dislipidemia y diabetes, a través de la educación sanitaria, nutrición, la actividad física y farmacoterapia, para con ello prevenir futuros eventos cardiovasculares en esta etapa de la vida o en la vida adulta, de esta forma se puede disminuir a mediano plazo la mortalidad por esta enfermedad.

Conclusiones:

- ▶ El número de células endoteliales maduras circulantes (CEMc) fue mayor en el grupo de jóvenes con obesidad.
- ▶ Se encontró una correlación positiva entre las CEMc con las células endoteliales progenitoras y la masa grasa.
- ▶ El número de CEMc por arriba del tercer tercil se asoció con el incremento de la adiposidad corporal, colesterol, LDL-c, y por arriba del segundo tercil con presión alterada y antecedentes de dislipidemia.
- ▶ Se encontró un incremento en los niveles séricos de ICAM-1 y de E-Selectina en los jóvenes con obesidad.
- ▶ El aumento de los niveles de sICAM-1 está asociado con colesterol, LDL-c y obesidad abdominal, y se incrementan a medida de que las alteraciones metabólicas se manifiestan en conjunto.
- ▶ El aumento en el número de CEMc y de los niveles de sICAM-1 se relacionan con la obesidad y la presencia de alteraciones metabólicas por lo que pueden ser considerados como factores predictores de la disfunción endotelial.

ANEXO1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN OBESIDAD Y DIABETES

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN
PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. _____

Por medio del presente autorizo que acepto participar en el proyecto de investigación titulado "**Marcadores de disfunción endotelial asociados con riesgo cardiovascular en jóvenes con obesidad y normopeso**"

El objetivo del estudio es evaluar las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, y lipoproteínas, del cual se me ha explicado que mi participación consiste en dejar que se me tome una muestra sanguínea y contestar una encuesta. Declaro que se me informó de los posibles riesgos, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio. El investigador se ha comprometido a responder a cualquier pregunta, a aclarar cualquier duda que pueda surgir a cerca de los procedimientos que se llevarán a cabo o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Como también me da la seguridad de que no me identificará en las presentaciones o publicaciones que se deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial, también se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada durante el estudio.

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma del entrevistador: _____



ANEXO 2

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes

Proyecto de:

"Marcadores de disfunción endotelial asociados con riesgo cardiovascular en jóvenes con obesidad y normopeso"

ENCUESTA

Fecha ____/____/____ Folio: _____

A. Datos generales.

Nombre: _____ Edad: ____ años Sexo: F M

Fecha de Nacimiento ____/____/____ Lugar de Nacimiento: _____

Domicilio actual: _____

Calle, No. Colonia, Ciudad

Teléfono: Casa _____ Cel. _____

Ocupación: _____ Unidad Académica _____

Estado Civil: 0. Soltero 1. Casado 2. Unión Libre 3. Divorciado 4. Viudo

Escolaridad: Licenciatura Maestría Doctorado _____

Número de hermanos _____ Ubicación en la familia _____ Hijos _____

B. Datos Socioeconómicos.

1. Localidad 0. Rural 1. Urbana

2. Su casa es: 0. Propia 1. Rentada 2. Prestada

3. ¿Cuántas personas habitan la casa? 0. 1-3 1. 4-6 2. Más de 6

4.- ¿Su vivienda cuenta con? Si No Cuenta con: Si No

Electricidad Teléfono
Drenaje Televisor
Agua potable Cocina con gas
Automóvil

5. Usted se considera de nivel socioeconómico? 0. Bajo 1. Medio 2. Alto

C. Hábitos.

6. ¿Fuma actualmente? 0. (NO) 1. (SI)
7. No. de cigarros al día. 0) Ninguno 1) <3 2) De 3 a 5 3) > de 5
8. ¿A la semana? _____
9. ¿A qué edad empezó a fumar? _____ años.
10. ¿Ingiere bebidas alcohólicas? 0. (NO) 1. (SI)
11. ¿Cuántas veces a la semana? 0) Ninguna 1) < de 3 2) de 3 a 5 3) > de 5
12. ¿Al mes? _____
13. ¿Tipo de bebida? _____
14. ¿A qué edad empezó a ingerir bebidas alcohólicas? _____ años.
15. ¿Realiza ejercicio?: 0.NO 1.SI Tiempo al día _____
Veces/semana _____ Tipo de ejercicio: _____
- Intensidad 0. Baja 1. Moderada 2. Alta
16. ¿Cuántas horas ve televisor?: No. horas/día _____ No. horas/semana: _____

D. Hábitos alimenticios.

17. ¿Cuántas comidas consume al día? _____ ¿Entre comidas? _____
18. ¿Cuáles? (Desayuno) (Almuerzo) (Comida) (Merienda) (Cena)
19. ¿Come en su casa regularmente? (Almuerzo) (Comida) (Cena)
20. Hace cuanto tiempo empezó a subir de peso _____
21. Se siente satisfecho con la forma de su cuerpo? 0. NO 1.SI
22. Como come? 0. Poco 1. Regular 2. Abundante
23. Repite ración en las comidas (plato)? 0. NO 1.SI
24. Dentro de su dieta alimenticia, señale el alimento que consume y con qué frecuencia lo hace:

	Rara vez	Frecuente	Siempre
	(1-2/semana)	(3-5/semana)	(> 5/semana)
a. Comida rápida (pizza, tacos, hamburguesas, Kentucky, etc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Golosinas y frituras (Dulces, chocolates, sabritas, etc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. Frutas y verduras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. Carnes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. Lácteos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. Refrescos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

E. Estado emocional.

25. Actualmente cual es su estado de ánimo? _____

26. Usted se considera: (Tranquilo) (Alegre) (Nervioso) (Enojón) (Triste)

27. ¿Padece insomnio? 0. (NO) 1. (SI)

28. ¿Toma algo para dormir? 0. (NO) ¿Qué? _____ 1. (SI)

29. ¿Cuántas horas acostumbra a dormir? _____

30. ¿Usted ronca? 0. (NO) 1. (SI)

F. Antecedentes de enfermedades crónicas en la familia.

	a	b	c	d	e	f	g	h	
a. Obesidad (Ob)	<input type="checkbox"/>	Mamá							
b. Diabetes Tipo2 (DM2)	<input type="checkbox"/>	Papá							
c. Diabetes Tipo1 (DM1)	<input type="checkbox"/>	Abuela Materna							
d. Hipertensión Arterial (HA)	<input type="checkbox"/>	Abuelo materno							
e. Enfermedad Cardiovascular (ECV)	<input type="checkbox"/>	Abuela paterna							
f. Infarto	<input type="checkbox"/>	Abuelo paterno							
g. Artritis reumatoide									
h. Enfermedades Hepáticas									
Otra ¿cuál?	_____								

G. Si es de sexo femenino.

31. Tiene un periodo menstrual normal? 0. NO 1.SI
32. Tiene tratamiento o reemplazo hormonal 0.NO 1.SI
33. Tiene Dx de Ovario poliquístico. 0. NO 1.SI

H. Infecciones

34. En los últimos 15 días ha sufrido alguna infección. 0.NO 1.SI
35. De qué tipo? a. Respiratoria b. Estomacal c. Epitelial d. Bucal
 e. Tracto Uro-Genital

Otra ¿Cuál? _____

I. Tratamiento.

36. ¿Actualmente se encuentra sometido a algún tipo de tratamiento?
 0. NO 1.SI
37. Para que padecimiento se lo recetaron? _____
38. Nombre de su medicamento. _____

J. Antropometría.

39. ¿Cuál fue su peso al nacer? _____ kg
40. Estatura actual (talla): _____ cm
41. Peso actual (kg): _____
42. IMC: _____
43. Cintura _____ cm Cadera _____ cm Índice C-C _____
44. Presión arterial diastólica _____ mmHg sistólica _____ mmHg
45. Temperatura _____ °C
46. Porcentaje de grasa corporal _____
47. masa grasa (kg) _____

NOMBRE Y FIRMA DEL ENCUESTADO(A)

Anexo 3

Kit de ensayo inmunoenzimático (ELISA) sICAM, sVCAM, sE-selectina y sMCP-1 humano (eBioscience)

Principio del método:

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Consta de las siguientes etapas:

1. Diluir las muestras 1:100 en el diluyente de muestras.
2. Lave las tiras dos veces con buffer de lavado.
3. Añadir 100 μ L diluyente de la muestra, por duplicado, a los pocillos del estándar excepto a los primeros pocillos.
4. Pipetear 200 μ L de estándar (sICAM-1, sVCAM, sE-selectina y sMCP-1, respectivamente en cada procedimiento) en los primeros pocillos del estándar y crear diluciones del estándar que van desde 10 hasta 0,625 ng / mL por la transferencia de 100 μ L de pocillo a pocillo. Desechar 100 μ L del último pocillo.
5. Añadir 100 μ L diluyente de la muestra, por duplicado, a los pocillos del blanco.
6. Añadir 100 μ L muestra diluida a los pocillos designados.
7. Preparar el conjugado-HRP.
8. Añadir 50 μ L de conjugado de HRP diluido a todos los pocillos.
9. Cubra las tiras e incubar 2 horas a temperatura ambiente (18 a 25 ° C), se recomienda que se agite.
10. Preparar la solución de sustrato TMB unos pocos minutos antes de su uso.
11. Vaciar y lavar las tiras de pocillos 3 veces con buffer de lavado.

12. Añadir 100 ml de solución de sustrato TMB a todos los pocillos, incluyendo los pocillos de los blanco.
13. Incubar las tiras de pocillos (microplacas) durante 15 minutos a temperatura ambiente temperatura (18 a 25 ° C).
14. Añadir 100 μ L de solución de paro a todos los pocillos incluidos los pozos en blanco.

Leer la placa en el espectrofotómetro, la intensidad de color medida a 450 nm.

Anexo 4

Citometría de flujo (BD Fasc Canton II)

Principio del método:

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros son:

- +Parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma.
- +Parámetros relacionados con características antigénicas de cada célula (inmunofenotipo).
- +Por lo tanto la CMF es capaz de identificar una célula por medio de sus características antigénicas y/o por sus características morfológicas de tamaño y complejidad.

Reactivos:

- Solución de lisis para eritrocitos.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) SIGMA (P4417-100 TBA).
- EDTA.
- Paraformaldehído.
- Azida de sodio.

*Preparación del buffer FACS

+5mL de BSA al 10%

+1mL de azida de sodio al 10%

+Se sugiere agregar 4 μ L EDTA para evitar la formación de grumos.

+Aforar a 500mL con PBS 1X.

***Preparación del Paraformaldehído.**

+0.5 μ L de Paraformaldehído.

+Aforar a 50 mL con PBS 1X.

+Calentar para disolver y filtrar

Procedimiento:

1. Por medio de punción venosa, obtener sangre total; rotular dos tubos de 1.5 mL, tubo 1 CEC y tubo 2 CPE respectivamente, alícuotar 100 μ L de sangre en cada uno.
2. Al tubo 1 agregar 5 μ L respectivamente de anticuerpo monoclonal para CD146-PE (BioLagen), CD34-FITC (BioLagen) y CD45-PerCP (BioLagen).
3. En el tubo 2 agregar 5 μ L respectivamente de anticuerpo monoclonal CD34-FITC, (BioLagen), CD133-PE (Miltenyi Biotec) y CD-45-PerCP (BioLagen).
4. Homogenizar suavemente y dejar incubar 20 min a 4°C un cuarto oscuro.
5. Agregar a los dos tubos 1mL de buffer de lisis de BD (Becton Dickinson), incubar 10 min a 4°C un cuarto oscuro.
6. Centrifugar durante 5min a 1500 rpm a 12 °C y decantar.
7. Una vez lisado, agregar 500 μ L de PBS, centrifugar a 1500 rpm a 12 °C y decantar.
8. Resuspender las células con 500 μ L de PBS para introducir en el citómetro y leer.

Cálculos:

El citómetro genera los resultados de la cuantificación de las células en histogramas y distribución relativa (porcentaje) de acuerdo a la platilla previamente diseñada para la captura de los datos, en una tabla la cual muestra el número de eventos en total de la población, así como también los de la población de interés

Bibliografía:

1. Abdelmoneim, S.S., Talwalkar, J., Sethi, S., Kamath, P., Fathalla, M.M.F., Kipp, B.R., 2010. A prospective pilot study of circulating endothelial cells as a potential new biomarker in portal hypertension. *Liver International* 30, 191–197.
2. Alexeeff, S.E., Coull, B.A., Gryparis, A., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Schwartz, J., 2011. Medium-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution and Markers of Inflammation and Endothelial Function. *Environmental Health Perspectives* 119, 481–486.
3. Bekkers, S.C.A.M., Yazdani, S.K., Virmani, R., Waltenberger, J., 2010. Microvascular Obstruction. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 1649–1660.
4. Boos, C.J., Soor, S.K., Kang, D., Lip, G.Y.H., 2007. Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 28, 1092–1101.
5. Calan, M., Calan, O., Gonen, M.S., Bilgir, F., Kebapcilar, L., Kulac, E., 2011. Examination of Adhesion Molecules, Homocysteine and hs-CRP in Patients with Polygenic Hypercholesterolemia and Isolated Hypertriglyceridemia. *Internal Medicine* 50, 1529–1535.
6. Cesarone, M.R., Belcaro, G., Pellegrini, L., Ledda, A., Vinciguerra, G., Ricci, A., 2006. Circulating Endothelial Cells in Venous Blood as a Marker of Endothelial Damage in Chronic Venous Insufficiency: Improvement with Venoruton. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 11, 93–99.
7. Chong, A., Lip, G., Freestone, B., Blann, A., 2006. Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: Comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin. *European Journal of Heart Failure* 8, 167–172.
8. Davel, A.P., Wenceslau, C.F., Akamine, E.H., Xavier, F.E., Couto, G.K., Oliveira, H.T., 2011. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44, 920–932.
9. Deanfield, J.E., Halcox, J.P., Rabelink, T.J., 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115, 1285–1295.
10. Devaraj, S., Jialal, I., 2012. Dysfunctional Endothelial Progenitor Cells in Metabolic Syndrome. *Experimental Diabetes Research* 2012, 1–5.
11. Dikov, M.M., Ohm, J.E., Ray, N., Tchekneva, E.E., Burlison, J., Moghanaki, D., 2005. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* 174, 215–222.
12. Fadini, G.P., Avogaro, A., 2010. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovascular Research* 87, 12–21.
13. Fürstenberger, G., Von Moos, R., Senn, H.-J., Boneberg, E.-M., 2005. Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis. *British Journal of Cancer* 93, 793–798.
14. Gealekman, O., Guseva, N., Hartigan, C., Apotheker, S., Gorgoglione, M., Gurav, K., 2011. Depot-Specific Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. *Circulation* 123, 186–194.
15. Gómez-Cerezo, J.F., Pagán-Muñoz, B., López-Rodríguez, M., Estébanez-Muñoz, M., Barbado-Hernández, F.J., 2007. The role of endothelial

- progenitor cells and statins in endothelial function: a review. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 5, 265–272.
16. Goon, P.K.Y., Lip, G.Y.H., Boos, C.J., Stonelake, P.S., Blann, A.D., 2006. Circulating Endothelial Cells, Endothelial Progenitor Cells, and Endothelial Microparticles in Cancer. *Neoplasia* 8, 79–88.
 17. Hagensen, M.K., Vanhoutte, P.M., Bentzon, J.F., 2012. Arterial endothelial cells: still the craftsmen of regenerated endothelium. *Cardiovascular Research* 95, 281–289.
 18. Herder, C., Baumert, J., Zierer, A., Roden, M., Meisinger, C., Karakas, M., 2011. Immunological and Cardiometabolic Risk Factors in the Prediction of Type 2 Diabetes and Coronary Events: MONICA/KORA Augsburg Case-Cohort Study. *PLoS ONE* 6, e19852.
 19. Jelic, S., Lederer, D.J., Adams, T., Padeletti, M., Colombo, P.C., Factor, P., 2009. Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag* 5, 909–920.
 20. Karastergiou, K., Evans, I., Ogston, N., Miheisi, N., Nair, D., Kaski, J.-C., 2010. Epicardial Adipokines in Obesity and Coronary Artery Disease Induce Atherogenic Changes in Monocytes and Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 1340–1346.
 21. Klop, B., Proctor, S.D., Mamo, J.C., Botham, K.M., Castro Cabezas, M., 2012. Understanding Postprandial Inflammation and Its Relationship to Lifestyle Behaviour and Metabolic Diseases. *International Journal of Vascular Medicine* 2012, 1–11.
 22. Lavrador, M.S.F., Abbes, P.T., Escrivão, M.A.M.S., Taddei, J.A. de A.C., 2011. Cardiovascular risks in adolescents with different degrees of obesity. *Arq. Bras. Cardiol.* 96, 205–211.
 23. Lee, B.P.-L., Imhof, B.A., 2008. Lymphocyte transmigration in the brain: a new way of thinking. *Nat. Immunol.* 9, 117–118.
 24. Lijnen, H.R., 2008. Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular Research* 78, 286–293.
 25. Mariucci, S., Rovati, B., Bencardino, K., Manzoni, M., Danova, M., 2010. Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects. *International Journal of Laboratory Hematology* 32, e40–e48.
 26. Mariucci, S., Rovati, B., Chatzileontiadou, S., Bencardino, K., Manzoni, M., Delfanti, S., 2009. A six- colour flow cytometric method for simultaneous detection of cell phenotype and apoptosis of circulating endothelial cells. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 69, 433–438.
 27. Martin, K., Stanchina, M., Kouttab, N., Harrington, E.O., Rounds, S., 2008. Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Obstructive Sleep Apnea. *Lung* 186, 145–150.
 28. Mathieu, P., Poirier, P., Pibarot, P., Lemieux, I., Despres, J.-P., 2009. Visceral Obesity: The Link Among Inflammation, Hypertension, and Cardiovascular Disease. *Hypertension* 53, 577–584.
 29. Onat, D., Brillon, D., Colombo, P.C., Schmidt, A.M., 2011. Human Vascular Endothelial Cells: A Model System for Studying Vascular Inflammation in Diabetes and Atherosclerosis. *Current Diabetes Reports* 11, 193–202.
 30. Osmond, J.M., Mintz, J.D., Dalton, B., Stepp, D.W., 2008. Obesity Increases Blood Pressure, Cerebral Vascular Remodeling, and Severity of Stroke in the Zucker Rat. *Hypertension* 53, 381–386.
 31. Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+)

- cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952–958.
32. Pierce, G.L., Beske, S.D., Lawson, B.R., Southall, K.L., Benay, F.J., Donato, A.J., 2008. Weight Loss Alone Improves Conduit and Resistance Artery Endothelial Function in Young and Older Overweight/Obese Adults. *Hypertension* 52, 72–79.
 33. Police, S.B., Thatcher, S.E., Charnigo, R., Daugherty, A., Cassis, L.A., 2009. Obesity Promotes Inflammation in Periaortic Adipose Tissue and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, 1458–1464.
 34. Rohatgi, A., Owens, A.W., Khera, A., Ayers, C.R., Banks, K., Das, S.R., 2009. Differential Associations Between Soluble Cellular Adhesion Molecules and Atherosclerosis in the Dallas Heart Study: A Distinct Role for Soluble Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, 1684–1690.
 35. Savoia, C., Sada, L., Zezza, L., Pucci, L., Lauri, F.M., Befani, A., 2011. Vascular Inflammation and Endothelial Dysfunction in Experimental Hypertension. *International Journal of Hypertension* 2011, 1–8.
 36. Slavik, L., Prochazkova, J., Prochazka, M., Simetka, O., Hlusi, A., Ulehlova, J., 2011. The pathophysiology of endothelial function in pregnancy and the usefulness of endothelial markers. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155, 333–337.
 37. Södergren, A., Karp, K., Boman, K., Eriksson, C., Lundström, E., Smedby, T., 2010. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res. Ther.* 12, R158.
 38. Steurer, M., Kern, J., Zitt, M., Amberger, A., Bauer, M., Gastl, G., 2008. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC Research Notes* 1, 71.
 39. Srijbos, M.H., Gratama, J.W., Kraan, J., Lamers, C.H., Bakker, M. den, Sleijfer, S., 2008. Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises. *British Journal of Cancer* 98, 1731–1735.
 40. Su, Y., Zheng, L., Wang, Q., Li, W., Cai, Z., Xiong, S., 2010. Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29, 27.
 41. Svenungsson, E., Cederholm, A., Jensen-Urstad, K., Fei, G.-Z., De Faire, U., Frostegård, J., 2008. Endothelial function and markers of endothelial activation in relation to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Rheumatol.* 37, 352–359.
 42. Tilg, H., Moschen, A.R., 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 6, 772–783.
 43. Van der Meer, I.M., 2002. Inflammatory Mediators and Cell Adhesion Molecules as Indicators of Severity of Atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 838–842.
 44. Veillard, N.R., 2004. Antagonism of RANTES Receptors Reduces Atherosclerotic Plaque Formation in Mice. *Circulation Research* 94, 253–261.
 45. Zachary, I., Glik, G., 2001. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res.* 49, 568–581.

46. Zampetaki, A., Kirton, J.P., Xu, Q., 2008. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Research* 78, 413–421.