



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“EL AUMENTO DE D-GLUCOSA EXTRACELULAR MODIFICA EL ESTADO
DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y LA FUNCIÓN DE ADHESIÓN DE
LAS CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO HUMANO TEMPRANAS.**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ÁREA
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**POR: Paulina Carola Tálitha Fernández Garcés
PROFESOR GUÍA: Dra. Soraya Gutiérrez Gallegos**

**Marzo 2023
Concepción, Chile.**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

DEDICATORIA:

*A mi dulce María Jesús,
quien llena mis días de juegos, sonrisas y abrazos.*

TABLA DE CONTENIDOS:

INDICE DE TABLAS:	VI
INDICE DE ILUSTRACIONES:	VII
GLOSARIO:	VIII
RESUMEN:	12
ABSTRACT:	14
1. INTRODUCCIÓN:	16
1.1. <i>Diabetes mellitus tipo 2:</i>	16
1.2. <i>Células Progenitoras de Endotelio (EPC):</i>	20
1.3. <i>Adhesión de EPC:</i>	27
1.4. <i>EPC y diabetes mellitus tipo 2:</i>	29
1.5. <i>Efecto del estrés oxidativo sobre el endotelio:</i>	32
1.6. <i>Efecto del estrés oxidativo sobre las EPC:</i>	36
1.7. <i>Efectos de las especies reactivas de oxígeno sobre el ADN:</i>	37
1.8. <i>Hipometilación del genoma y diabetes mellitus.</i>	40
2. HIPÓTESIS:	45
3. OBJETIVOS:	46
3.1 <i>Objetivo general</i>	46
3.2 <i>Objetivos específicos:</i>	46
4. MATERIAL Y METODOS:	47
4.1. <i>Recolección de muestras de sangre humana:</i>	47
4.2. <i>Cultivo de células Progenitoras de Endotelio Humano (hEPC):</i>	48
4.3. <i>Citometría de flujo:</i>	49
4.4. <i>Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario:</i>	49
4.5. <i>Estudio de la expresión génica mediante PCR y qPCR:</i>	50
4.6. <i>Análisis de viabilidad celular:</i>	51
4.7. <i>Extracción de ADN genómico:</i>	52
4.8. <i>Análisis de metilación global mediante slot blot:</i>	52
4.9. <i>Ensayo de adhesión de hEPC a matrix de fibronectina:</i>	53
4.10. <i>Análisis estadístico:</i>	54
5. RESULTADOS:	55
5.1. <i>Las células mononucleares humanas (MNC) se diferencian a células progenitoras endoteliales humanas (hEPC) in vitro:</i>	55
5.2. <i>Las altas concentraciones de D-glucosa no afectan la identidad de las hEPC ni la integridad de su ADN.</i>	59
5.3. <i>Las altas concentraciones de D-glucosa afectan la adhesión de las hEPC.</i> ..	64
5.4. <i>Altas concentraciones de D-glucosa generan hipometilación global del ADN en las hEPC.</i>	66
5.5. <i>La demetilación del genoma de hEPC conduce a una menor adhesión celular.</i>	69
5.6. <i>La alta D-glucosa produce demetilación activa del genoma de hEPC:</i>	74

6. DISCUSIÓN:	78
6.1. <i>hEPC y diabetes:</i>	78
6.2. <i>D-glucosa afecta la maduración y adhesión de hEPC:</i>	79
6.3. <i>Alta D-Glucosa genera hipometilación global en el ADN de hEPC:</i>	82
6.3. <i>Hipometilación del genoma independiente del aumento de expresión del gen de las enzimas TET :</i>	85
7. PROYECCIONES:	90
7. BIBLIOGRAFIA	97

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados.....	50
Tabla 2: Caracterización de donantes de sangre.	56

INDICE DE ILUSTRACIONES:

Figura 1: Movilización de EPC:.....	23
Figura 2: Homeostasis Redox:	34
Figura 3: Caracterización Morfológica de hEPC a 4 días.	56
Figura 4: Marcadores de superficie hEPC a 4 días de cultivo	57
Figura 5: Caracterización Inmunofenotípica.....	58
Figura 6: Viabilidad celular e integridad del ADN genómico.....	60
Figura 7: Caracterización hEPC en D-Glucosa.....	63
Figura 8: Altas concentraciones de D-glucosa disminuyen la adhesión de hEPC.....	65
Figura 9: Las hEPC cultivadas en alta concentración de D-glucosa muestran una disminución en el porcentaje de metilación del ADN.	68
Figura 10: Análisis de viabilidad y caracterización celular de hEPC cultivadas en 5-Aza-2dC.....	71
Figura 11: La disminución de la adhesión de hEPC está relacionada con la hipometilación global del genoma.....	73
Figura 12: La hipometilación de las hEPC en alta D-glucosa es por efecto metabólico y genera 5-hidroximetilcitosina.	75
Figura 13: Alta D-Glucosa no aumenta los niveles de expresión del ARNm de las enzimas TET1 y TET2.....	77
Figura 14: Efecto de las altas concentraciones de D-Glucosa (10mM y 20mM) sobre Células Progenitoras de Endotelio a 4 días de cultivo (hEPC-4d).	89

GLOSARIO:

5-Aza-2dC	:	5-aza-2'-desoxicitidina
5-caC	:	5-carboxilcitosina
5-fC	:	5-formilcitosina
5-mU	:	5-metiluracilo
5hmC	:	5-hidroximetilcitosina
5mC	:	5-metilcitosina
8-OHdG	:	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
AGE	:	Productos Avanzados de la Glicosilación
CACs	:	Células Angiogénicas Circulantes
CE	:	Células Endoteliales
CXCL12 /SDF-1.	:	Factor 1 Derivado de Células Estromales
DAG	:	Diacilglicerol
DDR	:	Respuesta de Daño al ADN
DM2	:	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
DNMT	:	ADN metiltransferasas
DU145	:	Línea Celular de Cáncer de Próstata
ECFC	:	Células Endoteliales Formadoras de Colonias
eNOS	:	Enzima Oxido Nítrico Sintasa Endotelial
ENS	:	Encuesta Nacional de Salud
FW	:	Factor de Von Willebrand

GAPDH	:	Glucosa-3-fosfato Deshidrogenasa
GM-CSF	:	Factor estimulante de colonia granulocito-macrófago
Gpx-1	:	Glutation Peroxidasa
H ₂ O ₂	:	Peróxido de Hidrógeno
HbA1c	:	Hemoglobina Glicada
HE	:	Endotelio Hemogénico
hEPC	:	Células Progenitoras Endoteliales Humanas
hOGG1	:	8-oxoguanina-ADN glicosilasa 1 humana
HUVECS	:	Células de Vena de Cordón Umbilical Humano
IDF	:	Federación Internacional de Diabetes
IL-8	:	Interleuquina 8
LDL	:	Lipoproteína de Baja Densidad
MCF10A	:	Línea Celular Epitelial de Glándula Mamaria
MNCs	:	Células Mononucleares
MVEC	:	Células Endoteliales de Microvasculatura Humana
NAD ⁺	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Oxidado
NADH	:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
NO	:	Óxido Nítrico
O ²⁻	:	Anión Superóxido
OH-	:	Radicales Hidroxilo
PARP	:	Poli ADP Ribosa Polimerasa
Pb	:	Pares de Bases
PBS 1X	:	Buffer Salino Fosfato 1x

PBSE	:	Buffer Salino Fosfato con EDTA
PFA	:	Paraformaldehído
PKC	:	Proteína Quinasa C
PIGF	:	Factor de Crecimiento Placentario
ROS	:	Especies Reactivas del Oxígeno.
SOD	:	Superóxido Dismutasa
TET	:	Enzimas de Traslocación diez-once
TGF	:	Factor Transformante de Crecimiento
VCAM1	:	Proteína 1 de Adhesión Celular Vasular
VEGF	:	Factor de Crecimiento Endotelial Vasular
VEGFR2	:	Receptor 2 para el Factor de Crecimiento Endotelial Vasular
ZR-75	:	Línea Celular de Cáncer de Mama

RESUMEN:

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), constituye una enfermedad metabólica atribuida a factores genéticos y ambientales, que afecta las funciones angiogénicas de las Células Progenitoras Endoteliales Humanas (hEPC) las cuales no logran ser restauradas en respuesta a un buen control glicémico, manteniendo así, alterada su función en el tiempo. Por lo tanto, es probable que la exposición permanente a un ambiente con niveles de glucosa superiores a los valores plasmáticos normales (5mM o 90mg/dl), produzca alteraciones a nivel epigenético que puedan explicar la mantención de las alteraciones angiogénicas en las EPC.

En la presente investigación, hEPC fueron cultivadas durante 4 días (hEPC-4d) en 5mM (90mg/dl) de D-Glucosa, concentración equivalente a valores plasmáticos normales, 10mM (180mg/dl) para simular una concentración de D-Glucosa considerada como "clínicamente aceptable" en pacientes diabéticos, y 20mM (360mg/dl) de D-glucosa para simular un ambiente hiperglicémico en pacientes diabéticos. Posteriormente, se evaluó la capacidad de adhesión de las células a una matriz de fibronectina. Para evaluar si las concentraciones de D-glucosa tenían impacto en los niveles de metilación global del ADN de hEPC-4d, se midieron los niveles de 5-metilcitosina (5mC), 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y los niveles de expresión de los genes *TET1* y *TET2*.

Los resultados obtenidos indican que la suplementación del medio de cultivo con 20mM de D-Glucosa resulta en una disminución de la adhesión celular y adicionalmente, al cultivar las células hEPC-4d en 10mM y 20mM se puede observar una hipometilación global del ADN, y un aumento de 5hmC. Estos cambios en el patrón de metilación no fueron acompañados por cambios en los niveles de ARNm de los genes *TET1* y *TET2*. Por lo tanto, se concluye que 20mM de D-glucosa genera una hipometilación del genoma en las hEPC-4d y una disminución de su capacidad de adhesión, fenómeno independiente de los niveles de expresión de los genes *TET1* y *TET2*.

Aunque la concentración de D-Glucosa considerada como glicemia "clínicamente aceptable" en un paciente diabético (10mM o 180mg/dl), no produce cambios significativos en la adhesión de hEPC-4d, sí se observa una hipometilación global del genoma, que podría ser la responsable de la alteración de las funciones angiogénicas de estas células en pacientes que, desde el punto de vista clínico, tienen un buen control en los niveles plasmáticos de glucosa.

ABSTRACT:

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disease attributed to genetic and environmental factors, which affects the angiogenic functions of Human Endothelial Progenitor Cells (hEPC). This function cannot be restored in response to good glycemic control, maintaining their function altered over time. Therefore, permanent exposure to an environment higher than normal plasma values (5mM or 70mg/dl) is likely to generate alterations at the epigenetic level that may explain the maintenance of angiogenic alterations in EPC.

In the present investigation, hEPC were cultured for 4 days (hEPC-4d) in 5mM (70 mg/dl) of D-Glucose, equivalent to normal plasma values, 10mM (180mg/dl) to simulate a concentration of D-Glucose considered as "clinically acceptable" in diabetics patients, and 20mM (360mg/dl) of D-glucose to simulate a hyperglycemic environment in diabetics patients. Then, we evaluated the adhesive capacity of the cells to a fibronectin matrix. To determine if the concentrations of D-glucose had an impact on the levels of global DNA methylation of hEPC-4d, the levels of 5-methylcytosine (5mC), 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and the expression levels of the *TET1* and *TET2* genes were measured.

The results obtained, indicate that the supplementation of the culture medium with 20mM of D-Glucose results in decreased cell adhesion and additionally, when cultivating the hEPC-4d in 10mM and 20mM, a global hypomethylation of the DNA can be observed, as well as an increase in 5hmC level. These changes in the methylation pattern were not accompanied by changes in the mRNA levels of the *TET1* and *TET2* genes. Therefore, it is concluded that 20mM of D-glucose generates a genome hypomethylation in hEPC-4d and a decrease in their adhesion capacity, a phenomenon independent of the expression levels of the *TET1* and *TET2* genes.

Although the concentration of D-Glucose considered as "clinically acceptable" glycemia in a diabetic patient (10mM or 180mg/dl), does not produce significant changes in the adhesion of hEPC-4d, a global hypomethylation of the genome, was observed, which could be responsible for the alteration of the angiogenic functions of these cells in patients who, from a clinical point of view, have good control of plasma glucose levels.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2:

Diabetes Mellitus constituye una patología crónica, producida por un déficit en la secreción de insulina o por una incorrecta utilización de ésta por parte del organismo (Cencioni et al., 2014). Esta patología se caracteriza por cursar con niveles de glucosa permanentemente elevados en el torrente sanguíneo, fenómeno denominado hiperglicemia (Costes, Bertrand, & Ravier, 2021). Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad se clasifica en tres principales grupos: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y diabetes gestacional (Alberti & Zimmet, 1998; Meigs, 2019). Sin embargo, DM2 representa el 95% los casos de diabetes, caracterizándose por ser una patología multifactorial involucrando en su génesis factores hereditarios, medioambientales y epigenéticos (Ahmed, Ansari, Mensah-Brown, & Emerald, 2020).

A nivel epidemiológico, la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), registró que en el año 2021, 537 millones de personas entre los 20 a 79 años presentaron diabetes, proyectándose que para el 2030 la población con diabetes alcanzará 643 millones de individuos, llegando a los 783 millones para el 2045 en dicho rango etario (International Diabetes Federation, 2021). En Chile, según la Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2017, existe una prevalencia de 12,3% en cuanto a sospecha de DM2, en comparación a un 9% registrado en la

ENS del año 2010, observándose un aumento de 4,2% en la sospecha de DM2 en la población menor a 45 años entre los años 2010 y 2017 (Claudio Gutiérrez Vásquez, 2021). Estos datos epidemiológicos a nivel mundial y nacional demuestran el impacto en la incidencia de DM2 en la población generando una problemática en salud pública, causada por la alta carga de morbilidad y mortalidad asociada a esta condición.

Esta enfermedad es una patología compleja definida como una enfermedad metabólica que, como se señaló anteriormente, se caracteriza por cursar con hiperglicemia permanente (Cencioni et al., 2014; Schmidt, 2018) causada por una combinación de dos factores principales: secreción defectuosa de insulina por parte de las células β pancreáticas y la incapacidad de los tejidos sensibles a la insulina para responder a ésta (Roden & Shulman, 2019). Los factores de riesgo de DM2 involucran una combinación compleja de factores genéticos, metabólicos y ambientales que interactúan entre sí contribuyendo a su prevalencia (Galicia-Garcia et al., 2020). Aunque la predisposición individual a desarrollar DM2 por factores de riesgo no modificables (etnicidad y antecedentes familiares/predisposición genética) posee una fuerte base genética, la evidencia de estudios epidemiológicos sugiere que muchos casos de DM2 pueden prevenirse mejorando los principales factores de riesgo modificables (obesidad, sedentarismo y dieta no saludable) destacando la importancia del ambiente en el desarrollo de esta patología (Hu et al., 2001; Schellenberg, Dryden, Vandermeer, Ha, & Korownyk, 2013).

Una de las principales características de esta enfermedad es la hiperglicemia crónica, siendo las células endoteliales vasculares susceptibles a desarrollar hiperglicemia intracelular, debido a que la glucosa se difunde pasivamente a través de su membrana plasmática (Roden & Shulman, 2019). En DM2, este exceso de glucosa puede ser metabolizado por la vía del sorbitol a sorbitol y fructosa por la enzima aldosa reductasa, la cual activa la vía metabólica secundaria de la aldosa reductasa, con oxidación concomitante de NADPH a NADP⁺ y reducción de NAD⁺ a NADH. La depleción de NADPH y aumento de la relación citosólica NADH/NAD⁺ conduce a un cambio en el potencial redox que acelera la glicólisis y aumenta la síntesis *de novo* de Diacilglicerol (DAG) (Brownlee, 2001), como resultado, se activa la proteína quinasa C (PKC) la cual disminuye la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y por lo tanto, se reduce la síntesis de óxido nítrico (NO). Estos efectos generan permeabilidad vascular y aumento en la contractilidad. Simultáneamente, el aumento de la relación NADH/NAD⁺ genera una mayor producción de oxígeno molecular (O₂), oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL), efectos citotóxicos sobre las células endoteliales y reducción de la disponibilidad de NO, conduciendo a disfunción endotelial (Godo & Shimokawa, 2017; Roden & Shulman, 2019). Adicionalmente, la sobreproducción de aldosas por la vía del sorbitol promueve la glicosilación de proteínas que participan en la formación de productos estables de Amadori (como la hemoglobina glicosilada) y Productos Avanzados de la Glicosilación (AGE). Éstos contribuyen a un aumento de la

actividad oxidante y, en consecuencia, a la producción de ROS, aumentando el estrés oxidativo y evitando la liberación de NO, produciendo así lesiones vasculares. Adicionalmente, los AGES reducen la biodisponibilidad y actividad del NO derivado del endotelio, comprometiendo aún más la actividad vascular (Dariya & Nagaraju, 2020).

Estos fenómenos fisiopatológicos que ocurren en el paciente con DM2, son los responsables a largo plazo, del inicio de las complicaciones de origen microvascular, como retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética y complicaciones macrovasculares como cardiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebro vascular (Forsslund & Archdeacon, 2015; International Diabetes Federation, 2021). Esto se debe a que el endotelio es fundamental en la regulación del tono y estructura vascular ya que libera de manera equilibrada factores de relajación y contracción (Godo & Shimokawa, 2017). En los pacientes con DM2, este equilibrio se altera, debido a la disfunción endotelial, estrés oxidativo, hiperreactividad plaquetaria e inflamación presentes en esta patología, desembocando en la alteración de las propiedades fisicoquímicas de la pared vascular conduciendo a un aumento de la vasoconstricción, desarrollando por ejemplo, aterosclerosis y formación de trombos (Goldberg, 2009).

Como mecanismo de homeostasis interna frente a estos tipos de injuria vascular, en la zona de origen de estas lesiones, el organismo responde fisiológicamente a través de la reendotelización y angiogénesis, las cuales son

acciones necesarias para la restauración de la homeostasis vascular (Pearson, 2009). Inicialmente se pensaba que estos procesos se producían exclusivamente a través de la migración y proliferación de células endoteliales maduras adyacentes a la lesión endotelial, sin embargo, en los últimos años se ha centrado la atención en un nuevo mecanismo de reparación vascular que implica a precursores endoteliales, denominados Células Progenitoras de Endotelio Humano (hEPC).

1.2. CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO (EPC):

Las Células Progenitoras de Endotelio Humano se caracterizan por ser células con capacidad de auto renovación, proliferación y diferenciación (Chopra, Hung, Kwong, Zhang, & Pow, 2018; Ma et al., 2019), fueron descritas por primera vez por el grupo de investigación de Asahara (Asahara et al., 1997), quienes demostraron que células hematopoyéticas CD34⁺/KDR⁺ aisladas desde sangre periférica podían diferenciarse en células endoteliales, y que frente a condiciones de hipoxia/isquemia contribuían a la formación de nuevos vasos sanguíneos. (Jujo, li, & Losordo, 2008; Marçola & Rodrigues, 2015).

Desde su descubrimiento se han postulado diversos orígenes del cual provienen estas células, y en el último tiempo se ha reportado que las EPC circulantes derivan de diversos tejidos con procesos angiogénicos activos como el tejido adiposo, tejido cardiaco, tejido conectivo del cordón umbilical o gelatina de Wharton, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, entre otros (Chopra

et al., 2018; Fujisawa et al., 2019; Tura et al., 2013). Sin embargo, las EPC que residen en médula ósea tienen su origen en el hemangioblasto (Kennedy, D'Souza, Lynch-Kattman, Schwantz, & Keller, 2007) que corresponde a un precursor común en médula ósea, el cual da lugar a las líneas hematopoyéticas y endoteliales de las cuales provienen las células de endotelio hemogénico (HE) caracterizadas por presentar un marcaje C-kit (CD117)⁺, receptores de angiopoyetina (Tie2)⁺, CD41, GATA1⁺ y RUNX1⁺; y que se diferencian en Células Madres Hematopoyéticas RUNX1⁺ y CD45⁺ y en las Células Progenitoras Endoteliales RUNX1⁺, CD45⁺ y KDR⁺ (Keighron, Lyons, Creane, O'Brien, & Liew, 2018). A la fecha, se han desarrollado diversos enfoques para identificar EPC, entre ellos el análisis de marcadores de superficie celular a través de citometría de flujo, y aunque no se ha identificado ningún marcador específico para estas células, se ha utilizado sistemáticamente un panel de marcadores que permite distinguirlas claramente, destacando principalmente la expresión de CD34⁺, KDR⁺, CD133⁺ (Jujo et al., 2008; Xing, Zhao, Liu, & Fan, 2020) y la presencia de CD31, Factor de von Willebrand (FW) y VE-cadherina en estados de maduración más avanzados (Balaji, King, Crombleholme, & Keswani, 2013).

A nivel funcional, se ha evidenciado que estas células al trasplantarse en las extremidades posteriores isquémicas de ratas atímicas incrementan la angiogénesis, efecto evaluado a través de análisis doppler el cual permite determinar el flujo sanguíneo a través de la red vascular (Aoki, Yasutake, & Murohara, 2004). Estudios de angiogénesis *in vitro* realizados en matrigel, han

demostrado que las hEPC forman estructuras tipo capilares, (proceso evaluado a través de la medición del área de estructuras tubulares formadas en la matriz), propiedad que depende del estadio madurativo de la célula (Hur et al., 2004; Mukai et al., 2008). Es así, como EPC tempranas (tres a siete días de cultivo) no forman estructuras tipo capilares por sí sola (Shumiya et al., 2010), sino que se incorporan a una red tubular pre existente y secretan citoquinas angiogénicas como interleuquina 8 (IL- 8), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), entre otras moléculas (Rehman, Li, Orschell, & March, 2003). Actualmente, dependiendo de la forma de cultivo, las EPCs tempranas reciben el nombre de Células Angiogénicas Circulantes (CACs) o Unidades de Células Formadoras de Colonias de Hill (Basile & Yoder, 2014; Hill et al., 2003; Keighron et al., 2018; Rohde et al., 2011; Vasa et al., 2001), sin embargo, independiente del nombre, su función principalmente es la secreción paracrina de dichas citoquinas. Por otro lado, las EPC tardías (más de tres semanas en cultivo) denominadas actualmente Células Endoteliales Formadoras de Colonias (ECFC) (Basile & Yoder, 2014; Hill et al., 2003) no secretan citoquinas, pero sí forman estructuras tipo capilares *in vitro* (Hur et al., 2004; Mena et al., 2018) y su fenotipo es endotelial (Chopra et al., 2018) (Figura 1).

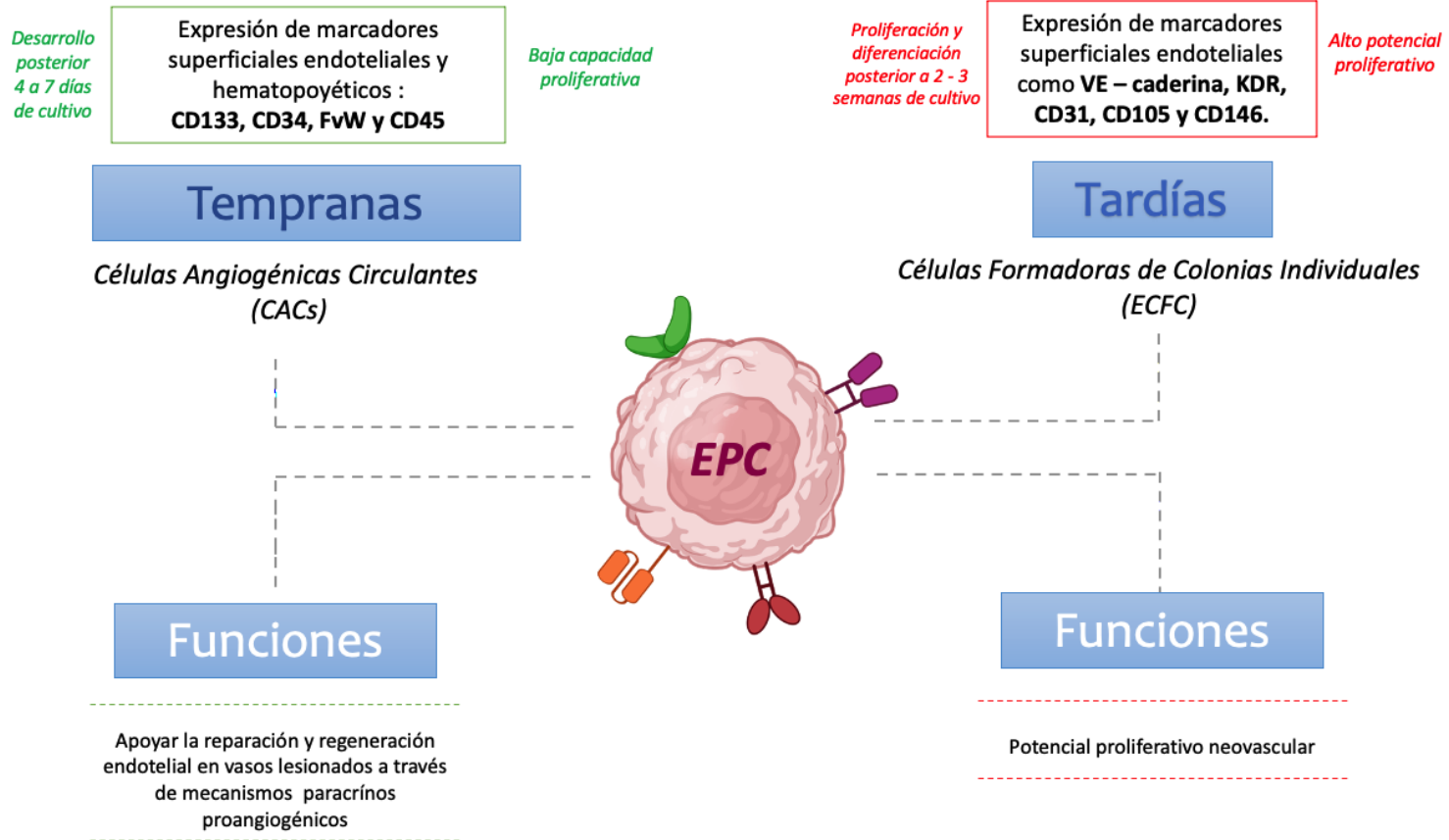


Figura 1: Movilización de EPC:

Las hEPC engloban a dos subpoblaciones (células de crecimiento temprano y crecimiento tardío), las cuales presentan diferencias morfológicas y funcionales. Además, exponen diferentes marcadores de superficie que permiten su caracterización (Chong, Ng, & Chan, 2016; Hur et al., 2004; Timmermans et al., 2009)

Las EPC son movilizadas principalmente desde médula ósea frente a hipoxia o isquemia, en respuesta a señales quimiotácticas como las generadas por el factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF), señales mediadas por Factor 1 Derivado de Células Estromales (CXCL12 o SDF-1), el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular o VEGF entre otras moléculas (Sun, Huang, & Sun, 2020; Tilling, Chowienczyk, & Clapp, 2009; Y. Zhang et al., 2014).

SDF-1 es una quimoquina CXC codificada en el cromosoma 10 que presenta dos isoformas alternativas, SDF-1 α , la cual es una proteína de 89 aminoácidos predominantemente denominada SDF-1, y SDF-1 β que contiene cuatro aminoácidos más en el extremo amino terminal (Shirozu et al., 1995). Esta quimoquina es considerada uno de los más potentes quimioattractantes de célula madre, ya sea hematopoyéticas o endoteliales (Sharma, Afrin, Satija, Tripathi, & Gangenahalli, 2011); es expresada en algunos órganos como músculo esquelético, hígado, cerebro y riñón, además se encuentra en células progenitoras y también en células estromales de médula ósea (Ratajczak et al., 2006). Estas células se encuentran en médula ósea, dando origen a diversos tipos celulares como osteocitos, osteoblastos, condrocitos, entre otros linajes, por lo tanto, cualquier alteración en los niveles de SDF-1 a nivel medular, activará la movilización de células madre a sangre periférica (JP et al., 2013). SDF-1 interacciona con su receptor CXCR4, el cual corresponde a un receptor acoplado a proteína G, compuesto por 352 aminoácidos. Está ubicado en el cromosoma 2, y se expresa en 2 isoformas: CXCR4 el receptor primario para

SDF-1, y una variante de mayor tamaño pero menos abundante denominada CXCR4-LO que difiere en los primeros nueve aminoácidos del extremo amino terminal (Sharma et al., 2011). CXCR4 es expresado en una variedad de células maduras como linfocitos, monocitos, megacariocitos, células primitivas como CD34+, células progenitoras hematopoyéticas y progenitoras endoteliales (Aiuti et al., 1999), el cual al interactuar con su ligando favorece la movilización de las células al sitio de la señal quimiotáctica.

Los genes de *SDF-1* y *CXCR4* son extremadamente conservados a través de diversas especies, sugiriendo su relevancia biológica en el desarrollo, además se ha observado en ratones, que la pérdida ya sea de SDF-1 o CXCR4, resulta en fenotipos similares de letalidad gestacional tardía y defectos en la linfopoyesis de células B, colonización de médula ósea y formación del séptum cardiaco (Nagasawa et al., 1996; Zou, Kottmann, Kuroda, Taniuchi, & Littman, 1998). A nivel vascular, una de las principales fuentes de SDF-1 son las plaquetas, las cuales se adhieren al endotelio lesionado, o a la matriz extracelular expuesta liberando una serie de moléculas, incluyendo SDF-1, que se une a su ligando CXCR4 presente en las EPCs, promoviendo así el reclutamiento de estas células al sitio de injuria vascular (Massberg et al., 2006).

Una vez en el sitio de la lesión las funciones angiogénicas de las EPC son estimuladas principalmente por VEGF, secretado tanto por las células endoteliales adyacentes a la lesión como por las propias EPC, esta molécula es un potente agente angiogénico codificado en el cromosoma 6, compuesto por

cinco factores relacionados estructuralmente: VEGFA (también denominado VEGFA165), VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento placentario (PIGF) (Koch & Claesson-Welsh, 2012). VEGFA regula todos los pasos claves del proceso angiogénico, incluida la proliferación y migración de las células endoteliales y progenitoras endoteliales (Lamallice, Le Boeuf, & Huot, 2007; Li et al., 2006; Morrone et al., 2021; Shumiya et al., 2010) con funciones mitogénicas, y morfogénicas en dichas células, siendo además clave en el proceso de angiogénesis normal y tumoral (Xie, Wei, Shi, & Huang, 2004). Esta molécula ejerce sus efectos a través de su receptor 2 tirosina quinasa VEGFR2 o KDR, el cual pertenece a una familia de receptores de VEGF, codificados en el cromosoma 4, en donde VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3 (FLT-4) son receptores de tirosina quinasa de superficie celular para VEGF (Xie et al., 2004). VEGFR2, es esencial para la biología de las células endoteliales, durante el desarrollo y en la vida adulta, en condiciones fisiológicas y patológicas uniéndose a VEGFA a través de dominios tipo inmunoglobulinas ejerciendo, vía MAP quinasas, las funciones angiogénicas antes descritas (Koch & Claesson-Welsh, 2012).

En resumen, cuando se presenta una lesión a nivel endotelial que altera el flujo sanguíneo, la hipoxia generada y las plaquetas presentes en la zona, estimularán la síntesis y liberación, respectivamente, de SDF-1, el cual ejercerá efecto quimiotáctico sobre las hPEC, a través de la interacción con su receptor CXCR4 (De Falco et al., 2004), una vez en el sitio de la lesión las funciones

angiogénicas de las hEPC son estimuladas principalmente por VEGF, el cual ejerce su efecto a través de su receptor VEGFR2, produciendo que finalmente VEGF regule el proceso angiogénico (Morrone et al., 2021; Shumiya et al., 2010).

1.3. ADHESIÓN DE EPC:

Uno de los pasos claves en el proceso de reparación vascular, es la adhesión de las EPC a la red vascular existente. Como parte del proceso de angiogénesis, la adhesión corresponde a un paso crítico, ya que, posterior a la llegada al sitio de lesión, las EPC deben interaccionar y adherirse a las CE activadas de la pared del vaso dañado, proceso mediado por las moléculas que se encuentran expresadas en su membrana, tales como selectinas e integrinas (Pyšná et al., 2019). Las integrinas corresponden a glicoproteínas de transmembrana que participan en las interacciones célula-matriz extracelular e interacción célula-célula, son conocidas por mediar la adhesión celular incluyendo la adhesión de las EPC a las proteínas de matriz extracelular (Mezu-Ndubuisi & Maheshwari, 2021). Adicionalmente, la matriz extracelular es un componente presente dentro de los tejidos y órganos que proporciona no sólo soporte físico para componentes celulares, sino también inicia señales bioquímicas y biomecánicas cruciales. El efecto directo de la matriz extracelular deriva principalmente de dos propiedades: capacidad de unir receptores celulares e integrinas y su capacidad de vincular factores de crecimiento (Birch, 2018). Esta interacción entre “*integrinas- matriz extracelular y EPCs*” en los sitios de remodelación vascular,

es un paso crucial en la reparación de la vasculatura dañada mediada por estas células (Tepper et al., 2002).

Actualmente, se ha definido un perfil de integrinas específico presente en la superficie de las EPC compuesto por $\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (Caiado & Dias, 2012; Deb et al., 2004). Destacando particularmente la acción de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (también conocida como VLA-4), la cual es clave en la localización y unión a las CE activadas de la zona dañada, utilizando como ligando principal la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y fibronectina (Baiula, Spampinato, Gentilucci, & Tolomelli, 2019; Caiado & Dias, 2012; Filippi et al., 2020). Jin y colaboradores (2006) observaron, tanto en modelos humanos como murinos, que la inhibición de esta integrina bloquea significativamente la adhesión celular a endotelios proliferativos tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su localización en la neovasculatura (Jin et al., 2006). Estos resultados fueron confirmados más tarde por Wary y colaboradores (2009) quienes, utilizando nuevamente modelos murinos con lesión vascular pulmonar, demostraron que el bloqueo o silenciamiento de la integrina $\alpha 4\beta 1$ afecta el direccionamiento y adhesión de EPC a los capilares pulmonares dañados, por lo cual esta molécula es fundamental para llevar a cabo la reparación de la barrera endotelial vascular (Wary, Vogel, Garrean, Zhao, & Malik, 2009).

1.4. EPC Y DIABETES MELLITUS TIPO 2:

Las hEPC en pacientes que padecen DM2, tienen un comportamiento diferente al descrito anteriormente. Tepper y colaboradores el año 2002 aislaron hEPC desde pacientes diabéticos tipo 2, observando en las hEPC tardías una menor proliferación en el cultivo celular, menor adhesión a Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana o HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) activadas con factor de necrosis tumoral α (TNF α) y menor integración a una red tubular preexistente formada en matrigel por Células Endoteliales de Microvasculatura Humana o MVEC (Microvascular Endothelial Cells), en comparación con pacientes sanos. Adicionalmente, en esta investigación se observó una correlación inversamente proporcional entre los niveles de Hemoglobina Glicada (HbA1c), la cual corresponde a un marcador de seguimiento diabetes tipo 2, con la capacidad de proliferación en cultivo de las células provenientes de pacientes con esta patología (Tepper et al., 2002). Estos estudios fueron confirmados más tarde por Egan y colaboradores (2008), quienes publicaron que los pacientes con DM2 (HbA1c $\geq 7,1\%$) presentan en circulación niveles significativamente más bajos de hEPC en comparación con pacientes sin la patología (HbA1c $< 7,1\%$) ($p < 0.05$) asociado a una disminución en la expresión de CXCR4 en las hEPC de dichos pacientes ($p=0.0037$) (Egan et al., 2008). Adicionalmente, las altas concentraciones de glucosa (HbA1c $> 7\%$) aumentan en la médula ósea los niveles de SDF-1, generándose mayor

cantidad de éste, el cual al interacciona con su receptor CXCR4 presente en las EPC que residen en la médula ósea, impide su liberación afectando de esta manera el número de EPC circulantes (Goligorsky, 2014; Kang, Ma, Liu, Fan, & Deng, 2017; Yiu & Tse, 2014).

Resultados similares fueron obtenidos por Yue y colaboradores (2011) quienes evidenciaron una disminución en el número de hEPC circulantes provenientes de pacientes con DM2 asociado a un aumento en la rigidez arterial, parámetros que engloba las propiedades de distensibilidad, compliance y elasticidad vascular, las cuales son alteradas en pacientes con DM2 (Yue et al., 2011). Estos resultados fueron apoyados más tarde por Kang y colaboradores (2017) quienes observaron que las hEPC aisladas de sujetos sanos expuestos a condiciones de alta D- Glucosa (20 a 25mM de D-Glucosa) o hEPC aisladas de pacientes diabéticos ($HbA1c \geq 7,1\%$), exhiben un número reducido de unidades formadoras de colonias de células endoteliales, disminución en la diferenciación celular, proliferación, adhesión y migración, formación de estructuras tipo capilares, secreción, movilización y localización, en comparación con los controles (Kang et al., 2017).

Paralelo a estos estudios, también se ha observado que los pacientes con esta enfermedad, pese a alcanzar el objetivo terapéutico clínico de mantener una hemoglobina glicosilada menor al 7%, presentan alteraciones tanto en la funcionalidad como en el número de hEPC circulantes, alcanzando sólo un 60% aproximadamente de hEPC circulantes en comparación con los pacientes sanos

($p < 0,001$) (Balestrieri et al., 2013; Churdchomjan et al., 2010). Por lo tanto, considerando el rol de las hEPC en la reparación y mantención de la vasculatura, la evidencia existente apunta a que el paciente diabético en el transcurso de su vida podría desarrollar progresivamente las complicaciones vasculares clásicas de esta enfermedad, ya que pierde uno de los principales mecanismos que participan en la restauración de la homeostasis vascular (Balestrieri et al., 2013).

Este evento fue estudiado por Egan y su grupo de investigación, quienes examinaron 98 pacientes, de los cuales 15 murieron durante el período de seguimiento de 10 años (15,3%), en donde la causa de muerte estuvo relacionada en un 80% con eventos cardiovasculares y vasculares (12 de 15 pacientes), los investigadores observaron que durante este periodo de seguimiento (125 meses), los pacientes fallecidos presentaron aproximadamente una disminución del 50% de los niveles de hEPC circulantes entre el periodo de inicio del estudio y su muerte, concluyendo así que los niveles bajos de hEPC pueden ser utilizados como potenciales biomarcadores, asociados a la severidad de las patologías cardiovasculares en pacientes con DM2 (Egan et al., 2018). En esta misma línea, el estudio prospectivo de diabetes del Reino Unido demostró que el control glicémico intensivo tiene un efecto benéfico sobre los pacientes con DM2, ya que reduce el riesgo de complicaciones diabéticas, como eventos cardiovasculares adversos y por lo tanto la mortalidad asociada a dichos eventos (Grupo UKPDS 1998; (Holman, Paul, Bethel, Matthews, & Neil, 2008). Adicionalmente Patel y colaboradores

(2008) demostraron que la intensificación del control glicémico en pacientes con DM2 ($HbA1c \leq 6,5 \%$) produce una reducción relativa del 10% en el resultado combinado de eventos macrovasculares y microvasculares mayores (Patel et al., 2008). En consecuencia, la Asociación Estadounidense de Diabetes ha establecido que, mantener un control glicémico adecuado, es la piedra angular del cuidado de la diabetes.

1.5. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL ENDOTELIO:

Desde el punto de vista bioquímico, una de las principales características de DM2 es la hiperglicemia crónica, la cual produce un alza en el flujo de la vía glucolítica y ciclo de Krebs, lo que en consecuencia ocasiona una sobre estimulación de la actividad de la cadena transportadora de electrones, generando un aumento del gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna, y con ello, un incremento de la vida media de los intermediarios de radicales libres de la coenzima Q, los cuales reducen el O_2 a ion superóxido (O_2^-), causando un marcado aumento de este último (Brownlee, 2001). Esto induce una disminución de la actividad de la glucosa-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima clave de la glucólisis, lo cual ocasiona un aumento de los metabolitos ubicados corriente arriba en la vía, generando como consecuencia la potenciación de la vía de los polioles, vía de la hexosamina, aumento de los AGEs y activación de isoformas PKC, procesos abordados anteriormente (Lima, 2018). Adicionalmente, los mecanismos antioxidantes celulares no logran

compensar el aumento en la producción de Especies Reactivas del Oxígeno o ROS (Reactive Oxygen Species), propiciando la generación de daño por estrés oxidativo (EO) (Juan, Pérez de la Lastra, Plou, & Pérez-Lebeña, 2021).

El término EO fue acuñado por primera vez en 1985 por Helmut Sies, definiéndolo como una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero (Sies, 1985), actualmente, se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes que favorece a los oxidantes, lo que lleva a una interrupción de la señalización y control redox así como también daño molecular. Las ROS engloban a los subproductos del metabolismo aeróbico, entre ellos el O_2^- , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^-) (Pisoschi & Pop, 2015) los cuales son utilizados por el sistema de defensa del huésped para combatir los patógenos (Pizzino et al., 2017). Las ROS se producen dentro de las células por fuentes endógenas como subproductos en organelos subcelulares como las mitocondrias, los peroxisomas y el citocromo P-450 y por fuentes exógenas que involucran principalmente contaminantes como tabaco, humo, drogas, xenobióticos, radiación entre otras moléculas (Prasad, Gupta, & Tyagi, 2017). Para prevenir el estrés oxidativo, las células están equipadas con una red de defensa antioxidante como las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa (Gpx1), superóxido dismutasa (SOD) entre otras, sin embargo, el desequilibrio entre éstos y los factores pro oxidantes conducen a esta condición de estrés oxidativo (Guillaumet-Adkins et al., 2017) (Figura 2).

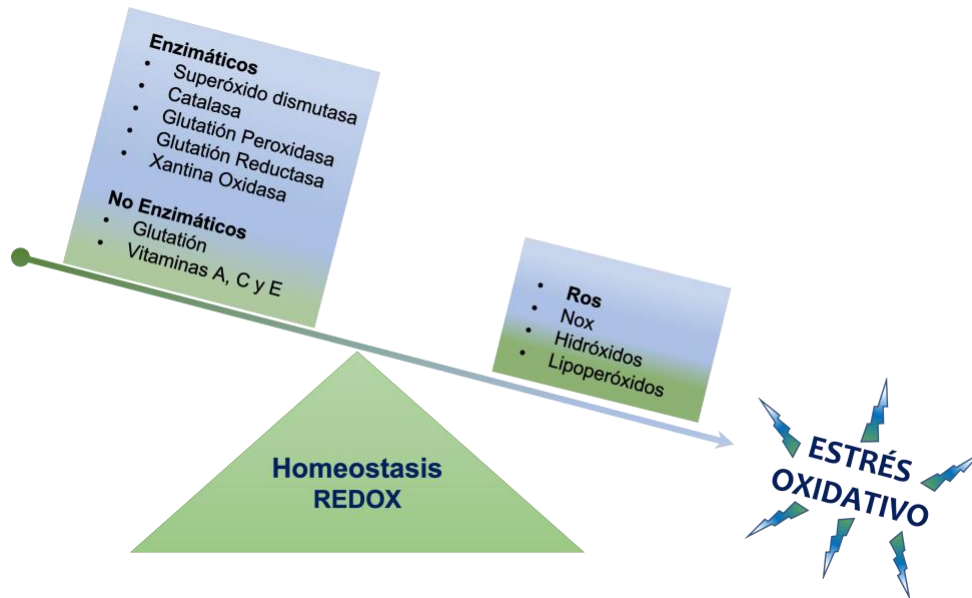


Figura 2: Homeostasis Redox:

Las células poseen una red de defensa antioxidante, que engloba mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que en homeostasis (izquierda) se encuentran en perfecto balance con los factores oxidantes (derecha). Al producirse un desbalance que favorece a los factores pro oxidantes se instaura el estrés oxidativo, el cual puede acarrear una serie de daños en el endotelio y dar paso a procesos patológicos. (Pisoschi & Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Singh et al., 2018).

Uno de los principales tejidos que se ve afectado por el estrés oxidativo es el endotelio vascular, el cual consiste en una monocapa de células que recubre todo el sistema circulatorio, jugando un papel esencial en la fisiología vascular a través de la vasoconstricción, vasodilatación, angiogénesis e inflamación (Vieceli Dalla Sega et al., 2017). El NO es el principal responsable del mantenimiento de la homeostasis vascular y su reducción o transformación en peroxinitrito por acción del anión superóxido gatilla la disfunción endotelial ya que promueve la

nitración de proteínas favoreciendo la destrucción de las células endoteliales (CE) (Incalza et al., 2018). Diversos autores han trabajado en torno al efecto del estrés oxidativo sobre las CE experimentando con variados linajes celulares; es así como en el año 1993, Lu y colaboradores al cultivar células endoteliales bovinas en presencia de H_2O_2 , observaron mediante electroforesis en dos dimensiones, la presencia de nuevas proteínas pertenecientes a enzimas antioxidantes, evidenciando así el proceso adaptativo que atraviesan las CE sometidas a estrés oxidativo (Lu, Maulik, Moraru, Kreutzer, & Das, 1993). Estos resultados fueron corroborados por el grupo de investigadores de Goulev quienes utilizando levaduras observaron que frente al estrés oxidativo se genera mayor tolerancia al estrés por parte de la célula para contrarrestar el daño generado por ROS (Goulev et al., 2017).

Montorfano y colaboradores en el año 2014 utilizando HUVEC cultivadas en medio enriquecido en H_2O_2 , observaron una disminución en los niveles de las proteínas endoteliales VE-cadherina y CD31 y un aumento en los marcadores de fibrosis α -SMA y FSP-1 así como un aumento de la expresión del Factor transformante de crecimiento β 1 y β 2 (TGF- β 1, TGF- β 2) En base a esto, los autores concluyeron que el estrés oxidativo induce la conversión de las CE en miofibroblastos a través de un mecanismo dependiente de TGF- β , cambiando el perfil de expresión de estas células. Por lo cual, las CE podrían adquirir un fenotipo senescente, contribuyendo a la disfunción endotelial (Montorfano et al., 2014; Ungvari et al., 2018).

1.6. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LAS EPC:

Al igual que las CE, las EPC también son blanco de las ROS, esto ha sido evidenciado en primera instancia ya que las ROS limitan la vida útil de las células madre hematopoyéticas *in vivo* (Ito et al., 2006). El año 2017 D'apolito y colaboradores cultivaron células mononucleares en presencia y ausencia de urea con el objetivo de inducir la formación de ROS intracelular, observando una mayor senescencia asociada a una sobreexpresión de p65 y un aumento de la expresión del factor de transcripción nuclear NF κ B, de la proteína 1 de adhesión celular vascular (VCAM1) e interleuquina 6 (IL6), reduciendo el número de EPCs y su capacidad de diferenciarse en células CD31⁺/VEGFR2⁺ (D'Apollito et al., 2017). Resultados similares se han observado frente al tabaquismo, el año 2006 Michaud y colaboradores aislaron y cultivaron hEPCs a partir de células mononucleares provenientes de sangre periférica de personas fumadoras crónicas y no fumadoras, evidenciándose en el primer grupo un notable incremento en la producción de ROS, disminución en el número de hEPC, en la actividad proliferativa de éstas en respuesta a VEGF, así como en la capacidad migratoria de las células, es decir, una deteriorada diferenciación de hEPC a un fenotipo endotelial (Michaud, Dussault, Haddad, Groleau, & Rivard, 2006).

Adicionalmente ha sido reportado que el estrés oxidativo, evaluado mediante un aumento en la actividad de NADPH oxidasa y disminución en la biodisponibilidad de NO presente en pacientes diabéticos tipo 2, afecta la

propiedad de reendotelización de las hEPC (Sorrentino et al., 2007) y su reclutamiento a la zona de injuria vascular, en comparación con pacientes sanos (Sambuceti et al., 2009). Así mismo, la proliferación y funciones angiogénicas de las células, tanto de crecimiento temprano (CAC) como tardío (ECFC) se ven afectadas (Chen et al., 2007; Hamed, Brenner, Aharon, Daoud, & Roguin, 2009). Por otro lado, enzimas antioxidantes como la SOD1 y SOD3 y Gpx1 poseen un efecto beneficioso sobre la movilización de EPC y la neovascularización después de un proceso isquémico. Liu y colaboradores, utilizando un modelo de ratón transgénico con sobreexpresión de SOD1, SOD3 y Gpx-1 demostraron que la sobreexpresión de estas enzimas antioxidantes atenúa significativamente la producción de ROS y mantiene un nivel elevado de EPC circulantes. Los resultados obtenidos demostraron que la densidad capilar muscular aumenta significativamente en comparación con los ratones *wild type*, indicando que la sobreexpresión de enzimas antioxidantes. (SOD1, SOD3 y Gpx-1) genera un bloqueo en la producción de ROS en EPC (Liu et al., 2019).

1.7. EFECTOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO SOBRE EL

ADN:

La afección en las funciones de las EPC frente a ROS es el resultado de alteraciones o daño a nivel del ADN en las células, producidas por estas moléculas. Se define como daño en el ADN a los cambios que ocurren en la

estructura de éste (Auboeuf, 2020), los cuales pueden afectar la duplicación y transcripción de la información genética (Juan et al., 2021), por lo tanto, el daño causado en el ADN por las ROS puede ser de dos tipos: físico y químico.

El daño químico se genera producto de la interacción de los radicales libres a la doble hebra en el contexto de EO, siendo la base guanina especialmente susceptible a ello debido a su bajo potencial redox, causando importantes reacciones oxidativas, las cuales pueden llevar a mutaciones, carcinogénesis, apoptosis, necrosis y enfermedades hereditarias (Halim & Halim, 2019; Pizzino et al., 2017). El principal sitio de reacción del radical hidroxilo en las pirimidinas es el doble enlace entre el carbono 5 y el carbono 6 (C5-C6) y la reacción con el C8 de la guanina, la cual puede generar 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) o su forma oxidada, 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG) (Poetsch, 2020). Estas lesiones surgen como resultado del ataque del radical hidroxilo a la 2'-desoxiguanosina libre, formándose 8-OHdG, que a través de una reacción conocida como tautomerismo de ceto-enol, se transforma en el principal producto oxidado, 8-oxodG (Urbaniak, Boguszezewska, Szewczuk, Kaźmierczak-Barańska, & Karwowski, 2020). Actualmente, 8-OHdG, es considerado como un buen biomarcador del daño oxidativo en diabetes (AbuArrah, Yuli Setianto, Faisal, & Hamim Sadewa, 2021; Omari Shekaftik & Nasirzadeh, 2021) pues se han observado mediante ELISA, niveles leucocitarios de 8-OHdG significativamente más altos en pacientes con DM2 en comparación con pacientes controles ($p < 0,001$), así como niveles estadísticamente significativos más elevados de 8-

OHdG en pacientes con DM2 y microangiopatía respecto a pacientes sin microangiopatía ($p < 0,001$) (Ye et al., 2016).

Con relación al daño físico del ADN causado por ROS, este alude a roturas de ADN de cadena simple (SSB) o de cadena doble (DSB), lo que puede ser causado por ROS al extraer un átomo de hidrógeno desde la desoxirribosa, induciendo la pérdida de un protón desde la molécula afectada, lo que genera la inestabilidad de la hebra de ADN provocando quiebres en su estructura, (Juan et al., 2021). Frente a estas alteraciones, se despliega una red de eventos conocida como Respuesta de Daño al ADN (DDR) la cual involucra: a) detección del daño en el ADN, b) activación de los puntos de control c) arresto del ciclo celular, d) reparación, e) apoptosis y f) depuración por parte del sistema inmunológico de los desechos generados en el proceso (Huang & Zhou, 2020).

Dentro de los mecanismos de reparación se encuentran las enzimas Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP), las cuales pertenecen a una familia de proteínas involucradas en respuestas frente a estrés celular, reparación del ADN dañado, regulación transcripcional, entre otras funciones (Bai, Nagy, Fodor, Liaudet, & Pacher, 2015). Quiebres en el ADN inducidos por radicales libres, pueden implicar la activación de las PARP iniciando un ciclo de consumo de energía mediante la transferencia de unidades de ribosa ADP del NAD^+ a las proteínas nucleares. El resultado de este proceso es un rápido agotamiento del NAD^+ intracelular y del pool de ATP, lo que disminuye la tasa de glucólisis (García Soriano F et al., 2001) desacoplando la cadena transportadora de electrones

(Bai et al., 2015; Hegedűs & Virág, 2014). Adicionalmente, las enzimas PARP estimulan la transcripción de los genes de las enzimas TET para reparar el ADN (Ciccarone et al., 2014). Estas enzimas se encargan del proceso de demetilación activa del ADN, por lo tanto, frente a daños a nivel de la estructura del ADN, se inicia una demetilación del genoma a la vez que se inhibe la activación de las enzimas ADN metiltransferasa (DNMT), las cuales están encargadas de catalizar la transferencia de un grupo metilo al ADN, para generar ADN metilado. (Ciccarone et al., 2012; Dhliwayo, Sarras, Luczkowski, Mason, & Intine, 2014).

Considerando los antecedentes señalados, en el contexto de diabetes, la generación de radicales libres producto de la hiperglicemia permanente resulta en daños en el ADN vía estrés oxidativo (Brownlee, 2001), lo cual pudiese activar las vías descritas anteriormente, contribuyendo a la hipometilación del genoma. Este postulado fue comprobado experimentalmente por Dhliwayo y colaboradores (2014), quienes utilizando un modelo de pez cebra al cual se le indujo diabetes, concluyeron que la demetilación del genoma es el potencial mecanismo responsable de los daños persistentes generados por la hiperglicemia (Dhliwayo et al., 2014).

1.8. HIPOMETILACIÓN DEL GENOMA Y DIABETES MELLITUS.

La metilación del ADN se genera por la adición de grupos metilo (-CH₃) en la posición C5 del nucleósido citosina, formando 5-mC, la cual constituye

aproximadamente el 1% de todas las bases del ADN y se encuentra casi exclusivamente como metilación simétrica del dinucleótido CpG (Moore, Le, & Fan, 2013). Esta reacción es catalizada por las enzimas DNMT: ADN metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B; y la ADN metiltransferasa de mantenimiento o DNMT1, capaz de establecer un nuevo patrón de metilación, ya que actúa durante la replicación del ADN para copiar el patrón de metilación de la hebra molde en la cadena naciente. Como se señaló anteriormente, esta metilación ocurre preferentemente en dinucleótidos CpG, abarcando el 80% de estos residuos metilados en el genoma (Davison, Irwin, & Walsh, 2021). La contra parte de este proceso es la demetilación del ADN, la cual consiste en la remoción del grupo metilo de los nucleótidos de ADN. Este proceso puede ser activo o pasivo, entendiéndose como proceso pasivo, la reducción o ausencia de las enzimas DNMT, lo cual ocurre en la división celular donde la inhibición o disfunción de DNMT1 no genera la metilación de mantenimiento, por lo tanto, la citosina recién incorporada permanece sin metilar, reduciendo el nivel de metilación general después de cada división celular (Tiedemann, Eden, Huang, Robertson, & Rothbart, 2021).

El mecanismo activo de demetilación vía reparación del ADN, ha sido asociado a tres familias de enzimas: las enzimas TET (señaladas anteriormente) que hidroxilan la 5mC a 5hmC, la cual puede además ser oxidada a 5-formilcitosina (5-fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). La segunda familia de enzimas son las AID/APOBEC, que deaminan la 5mC o 5hmC a 5-metiluracilo (5mU), y

la tercera familia relacionada con glicosilasas que reparan el ADN por escisión de bases, reemplazando estos intermediarios (5mU, 5hmU o 5caC) por una nueva citosina y, por lo tanto, reemplazando el ADN metilado (Bhutani, Burns, & Blau, 2011; He et al., 2011; X. Wu, Li, & Xie, 2018). En el año 2014, Dhliwayo y colaboradores observaron en modelos de pez cebra con hiperglicemia inducida por estreptozotocina, un aumento en la expresión y actividad de las enzimas TET, seguida de un aumento en los niveles de 5hmC, y de una demetilación del genoma. De forma paralela, los investigadores revelaron que la inhibición de las enzimas PARP previene la demetilación del ADN (Dhliwayo et al., 2014). Ese mismo año Dayeh y colaboradores identificaron 1649 sitios CpG en el genoma de células beta pancreáticas aisladas de pacientes con DM2, los cuales presentaron una disminución en el porcentaje de metilación gen específica en pacientes con diabetes (97%), en comparación con los pacientes controles ($p < 0.05$) (Dayeh et al., 2014). Resultados similares han sido encontrados por Nilsson y colaboradores quienes identificaron 251 sitios CpG en genoma de hepatocitos provenientes de pacientes diabéticos tipo 2, con diferencias en el nivel de metilación en comparación con pacientes sano, observándose nuevamente una disminución (94%) en el porcentaje de metilación gen específica de las regiones estudiadas ($p < 0.05$). (Nilsson et al., 2015). Por lo tanto, es factible que en DM2, el ambiente hiperglicémico eventualmente modifique el estado de metilación global del ADN de las células incluyendo las hEPC, sin embargo, a la fecha no existen estudios que confirmen esta teoría.

En general, la metilación de regiones promotoras puede llevar a represión genética, mientras que metilaciones en el cuerpo del gen pueden regular la transcripción y splicing alternativo (Reddy, Zhang, & Natarajan, 2015). La metilación del ADN promueve la unión al grupo metilo de proteínas que pueden reclutar correpresores de la transcripción y otras proteínas a través de interacciones *proteína-proteína*, alterando así la expresión génica (Jones, 2012), de manera tal, que una demetilación del genoma pudiese significar la pérdida de correpresión de algunos genes involucrados en las complicaciones de la diabetes. Adicionalmente la demetilación del genoma involucra inestabilidad cromosomal debido a la activación de elementos previamente silenciados, como retrotransposones, ADN satélite, entre otros. Por lo tanto, en este contexto y considerando que la hipometilación pareciera ser un sello característico en DM2 independiente del tipo celular (Dayeh et al., 2014; Nilsson et al., 2015; Pirola et al., 2011; Volkmar et al., 2012; Yuan et al., 2019), es factible considerar desde un punto de vista molecular, que cambios en la metilación del ADN podrían ser los responsables de la persistente disfunción celular pese a la corrección del estímulo injuriente, pues como se ha mencionado anteriormente las evidencias indican que los pacientes que padecen DM2, presentan hipometilación del genoma y a la vez, alteración en funciones cruciales para la reparación vascular en las EPC, como por ejemplo la adhesión.

Sin embargo, con relación a DM2, a la fecha, no existen estudios que señalen el estado de metilación global de las hEPCs en pacientes con esta enfermedad, por lo consiguiente, es pertinente plantearse la siguiente pregunta biológica: ¿Un ambiente hiperglicémico genera cambios en los patrones de metilación global del ADN afectando la capacidad de adhesión de las Células Progenitoras de Endotelio Humano?

2. HIPÓTESIS:

Las altas concentraciones de D-Glucosa extracelular generan hipometilación global del genoma de las Células Progenitoras de Endotelio Humano Tempranas, alterando su capacidad de adhesión.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar si las altas concentraciones de D-Glucosa extracelular generan una hipometilación global del genoma de las Células Progenitoras de Endotelio Humano Tempranas alterando su capacidad de adhesión.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar el estado de metilación global del ADN en Células Progenitoras de Endotelio Humano tempranas (hEPC) cultivadas en medio con alta D-glucosa.
2. Establecer el rol de las enzimas TET en los cambios del estado de metilación de las hEPC tempranas cultivadas en altas concentraciones de D-glucosa.
3. Evaluar la relación existente entre el estado de metilación del ADN genómico y la capacidad de adhesión de las hEPC tempranas cultivadas en medio con alta D-glucosa.

4. MATERIAL Y METODOS:

4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE HUMANA:

Todos los procedimientos realizados en este estudio se rigen según la Declaración de Helsinki para el Trato Ético de Sujetos Humanos y por las Normas de Bioseguridad (FONDECYT -CONICYT, 2008). Adicionalmente, el presente estudio fue aprobado por las siguientes entidades: Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción y por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud de Concepción (aprobación número 19-10-102) quien aprobó el consentimiento informado aplicado por escrito a cada participante.

Los donantes fueron reclutados en la ciudad de Concepción, mediante la técnica de muestreo no probabilístico “bola de nieve”, siendo incluidos en el estudio todos aquellos que presentaron un perfil glucémico normal (glicemia en ayunas entre 90 mg/dl y 100 mg/dl) y excluidos del estudio todos aquellos donantes fumadoras, con alteraciones hematológicas o enfermedades de transmisión sexual, también fueron excluidos del estudio las personas que al momento del reclutamiento estuviesen pasando por una infección viral o bacteriana, mujeres embarazadas o lactantes y aquellas personas que no estuvieran dispuestas a firmar el consentimiento informado.

Cada donante fue sometido a una flebotomía en la vena del brazo para obtener primero una muestra de 3ml de sangre en un tubo de recolección con EDTA (destinado a la medición de glicemia) y luego se tomó un volumen aproximado de 50 ml de sangre con Buffer Salino 1X fosfato (1X PBS) y EDTA (5 mM) (PBSE) para derivar a cultivo celular. Ambas muestras se tomaron en la misma oportunidad utilizando una jeringa estéril.

4.2. CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS DE ENDOTELIO HUMANO (hEPC):

Las hEPC fueron aisladas de acuerdo con los protocolos descritos por Asahara y Vasa (Asahara et al., 1997; Vasa et al., 2001). 50mL de sangre total fueron mezclados con una solución de PBSE 5mM, luego las células mononucleares (MNCs) fueron extraídas a través de un gradiente de densidad mediante Histopaque 1070 (Sigma Chemical, Sigma Chemica Co, St Luis, MO). Una vez extraídas, las células fueron lavadas, y re suspendidas en PBSE para finalmente sembrarlas en medio de cultivo para células endoteliales (GIBCO BRL Life Technologies, Bethesda, MD, EE. UU.), suplementado con 20% de suero bovino fetal (Biological Industries, Israel) y factor de crecimiento para células endoteliales (10 µg/ml; GIBCO BRL Life Technologies, Bethesda, MD, EE. UU.), EE. UU). Las placas de cultivo fueron previamente cubiertas con fibronectina (1 µg/ml, Sigma) durante cinco minutos, una vez eliminada la fibronectina, las

células fueron montadas y cultivadas a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante cuatro días.

4.3. CITOMETRÍA DE FLUJO:

Las hEPC fueron despegadas de la placa de cultivo utilizando tripsina 0,25% -1X (Hyclone) durante 3 a 5 minutos y luego fueron contadas en una cámara Newbauer usando la técnica de exclusión con azul de tripán. Posteriormente 1x10⁵ células fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con 20µl de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD34 humano unido a APC (Becton Dickinson, San Diego, CA) y 40µl de anticuerpo anti-KDR de conejo (R&D System Inc., Mineápolis, Minnesota). Los análisis de Citometría de Flujo se realizaron en el Citómetro de Flujo Cell Sorter BD FACSAria III del Centro de Microscopía Avanzada CMA Bío-Bío, donde se determinaron los porcentajes de las subpoblaciones celulares CD34+/KDR-; CD34+/KDR+ y CD34-/KDR+ en cada muestra.

4.4. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO:

El ARN total fue extraído desde las hEPC cultivadas por cuatro días (hEPC-4d) utilizando el reactivo de extracción Direct-zol RNA (Zymo Research) según las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA fueron utilizados 2µg de RNA por reacción, 0.5µg de Oligo dT primer y agua libre de nucleasas (15µL volumen final), cada tubo fue incubado por 5 minutos a 70°C. Posteriormente a

cada tubo se le agregó buffer 5X M-MLV, dNTP (25mM concentración final), 25 unidades de inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen), 200 unidades de M-MLV RT (Invitrogen) y agua libre de nucleasas (25 µL de volumen final para reacción). Finalmente, cada tubo fue incubado durante 60 minutos a 42° C. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C.

4.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR Y qPCR:

Para cuantificar la expresión de los genes *CD31*, *OCT-4* y *CD34* *TET1* y *TET2*, se realizó un mix de reacción con 1µL de ADNc, 0,3 µM de cada partidador (forward y reverse) y el reactivo Máxima® SYBER Green/Rox qPCR Mater mix 1x (Thermo Scientific). Como gen de referencia y control de carga fue utilizado el gen de la Ribonucleoproteína D3 (*SNRPD3*). Los partidores de oligonucleótidos utilizados para la amplificación se encuentran registrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados

Gen	Secuencias	TM. (°C)	Tamaño de Producto esperado
<i>CD31</i>	F: 5'-CAACAGACATGGCAACAAGG-3' R: 5'-TTCTGGATGGTGAAGTTGGC-3'	58	240 pb.
<i>OCT-4</i>	F: 5'-CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA-3' R: 5'-CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA-3'	60	169 pb.
<i>CD34</i>	F: 5'-AATGAGGCCACAACAAACATCACA-3' R: 5'-CTGTCCTTCTTAAACTCCGCACAGC-3'	60	380 pb.
<i>TET1</i>	F: 5'-TTCGTCCTGCAACCTTAG-3' R: 5'-ATGCCTCTTCACTGGGTG-3'	57	149 pb.
<i>TET2</i>	F: 5'-TTTGCTCCTGTTGAGTTACA-3' R: 5'-TAACATGGGTGCGTTCTTC-3'	55	307 pb.
<i>SNRPD3</i>	F: 5'-TCTTCCTGCCAAGATGTCTA-3' R: 5'-TAACATGGGTGCGTTCTTC-3'	55	262 pb.

pb: pares de bases.

La reacción de qPCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo Stratagene® Mx3000P™ Thermal Cycler y los resultados obtenidos para los todos los genes fueron procesados con el programa Mx3000P expresando los resultados como cuantificación relativa de ARNm, utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ y análisis de las curvas de melting.

La confirmación de los tamaños de los productos esperados para *CD31* (240 pb), *OCT-4* (169 pb), *CD34* (380 pb), *TET1* (149 pb), *TET2* (307 pb) y *SNRPD3* (262 pb) se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en presencia de SYBR Safe (Invitrogen).

4.6. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR:

Las células hEPC fueron cultivadas durante cuatro días con diferentes concentraciones de D-glucosa (5, 10, 20, 30 y 35mM), a los cuatro días de cultivo fueron lavadas una vez con PBS 1X, marcadas con azul de tripán en PBS al 0,4% y posteriormente contadas en cámara Newbauer. Como control fueron consideradas las células cultivadas en 5mM de D-glucosa, estableciendo el número de células viables en esta condición como el 100% de viabilidad. Como control osmótico fue utilizado manitol a una concentración de 35mM.

4.7. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO:

El ADN genómico de las hEPC fue extraído a través del kit de extracción Nucleospin® blood column (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN extraído fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en presencia de SYBR Safe (Invitrogen).

4.8. ANÁLISIS DE METILACIÓN GLOBAL MEDIANTE SLOT BLOT:

El ADN genómico extraído de células cultivadas en altas concentraciones D-glucosa (10mM y 20mM) y concentraciones normales (5mM) fue desnaturalizado durante 10 minutos con NaOH 0,1M a 100°C, posteriormente la reacción fue neutralizada con acetato de amonio 6,6M (pH 7). 200ng de ADN fueron cargados y fijados en una membrana de nailon para posteriormente bloquearla durante dos horas con leche al 5% en PBS 1X -tween 0,5%. Transcurrido ese tiempo la membrana fue incubada por dos horas con anticuerpo primario anti-5'-metilcitosina 1:1000 (Calbiochem), luego de esto, la membrana se lavó tres veces con leche al 5% en PBS 1X - tween al 0,5% durante diez minutos. Después del último lavado, la membrana fue incubada durante una hora con anticuerpo secundario anti-mouse IgG-HRP 1:500 (Santa Cruz Biotechnology) para posteriormente lavarla durante diez minutos tres veces con leche al 5% en PBS 1X - tween al 0,5%. Finalmente, la membrana fue revelada exponiéndola durante

30 segundos al reactivo de revelado Pierce®ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

El análisis densitométrico fue realizado con el programa ImageJ (NIH, MD, EE. UU.) normalizando la señal emitida en el film con el ADN presente en la membrana el cual fue teñido con una solución de azul de metileno al 0,02% y acetato de sodio 0,2M. La presencia de 5-hidroximetilcitosina fue evaluada utilizando un anticuerpo primario anti-5'-hidroximetilcitosina 1:1000 (Calbiochem) siguiendo el mismo protocolo utilizado con el anticuerpo anti-5'-metilcitosina.

4.9. ENSAYO DE ADHESIÓN DE hEPC A MATRIX DE FIBRONECTINA:

Placas de cultivo de 24 pocillos fueron recubiertas en su interior con cubreobjetos e incubadas con 100µg/ml de fibronectina durante 2 horas a 37°C. Posteriormente la fibronectina fue retirada y las placas con los cubreobjetos en su interior se recubrieron con BSA al 1% durante 2 horas a 37°C. Terminado ese tiempo, el BSA fue eliminado y 3×10^5 hEPC previamente cultivadas durante cuatro días a 5 y 20mM de D-Glucosa, fueron sembradas en las placas preparadas previamente e incubadas durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las células no adheridas se retiraron suavemente con PBS 1X y las células adheridas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 40 minutos. Finalmente, después de retirar el PFA los pocillos fueron lavados tres veces con PBS 1X y cada cubreobjeto fue teñido con DAPI dilución 1:100 (Sigma Aldrich) e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad

para finalmente montarse sobre un portaobjeto. Doce horas después del montaje, 10 campos aleatorios por cada cubreobjeto de las células adheridas a la matriz de fibronectina fueron observados y contados a través de microscopía de fluorescencia en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) Bío-Bío. Las células cultivadas con 5 mM D-glucosa fueron consideradas como el 100% de adhesión celular.

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos obtenidos fueron procesados a través del software Graph Prism (San Diego, CA, EE. UU.). El análisis de significación estadística se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), según correspondiera. Los valores fueron trabajados con la media más el error estándar, donde n representó el número de repeticiones de la misma prueba, considerando como estadísticamente significativo un $p < 0,05$.

5. RESULTADOS:

5.1. LAS CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS (MNC) SE DIFERENCIAN A CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES HUMANAS (hEPC) *IN VITRO*:

Las hEPC de pacientes diabéticos tienen alteradas sus funciones angiogénicas básicas como la migración, la capacidad de formar vasos sanguíneos y capacidad de adhesión; sin embargo, no está del todo claro cómo la hiperglicemia afecta estas funciones. Por lo tanto, para comprender cómo este estímulo puede inducir la falla de la adhesión de hEPC, cultivos de hEPC fueron utilizados como modelo biológico.

Para aislar las hEPC, se utilizaron cultivos primarios de MNC derivados de pacientes no diabéticos (Tabla 2). Como se puede observar en las figuras 3A y 3B, después de cuatro días de cultivo las células presentaban una forma redondeada, sin signos morfológicos característicos de una célula endotelial madura (forma de huso).

Tabla 2: Caracterización de donantes de sangre.

Número	Edad (años)	Peso (kg)	Estatura (Mt.)	IMC (%)	Glicemia	Valor de Referencia
M1	31	77	1,75	25,1	86,2	90-100 mg/dl
M2	31	57	1,56	23,4	88,3	
M3	26	78	1,77	24,9	88,2	
M4	30	81	1,79	25,3	76,1	

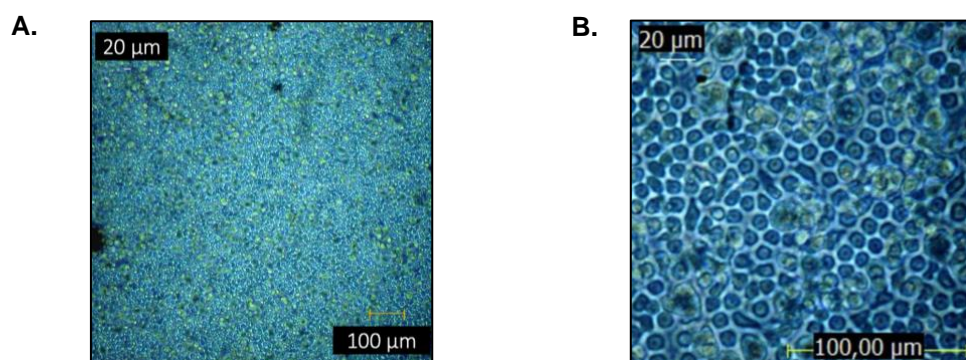


Figura 3: Caracterización Morfológica de hEPC a 4 días.

En la imagen **A** y **B** se muestran hEPC cultivadas por cuatros días en 5 mM de D-glucosa con un aumento de 10x y 40x respectivamente. Las imágenes son representativas de 5 campos.

Con el objetivo de caracterizar las células obtenidas de los cultivos de MNC, se analizó la presencia y los niveles de expresión de marcadores de superficie mediante reacción en cadena de la polimerasa, asociada a transcripción inversa (RT-PCR). En los resultados obtenidos se observa la presencia de ARNm para los marcadores de inmadurez celular Oct-4 (169 pb) y CD34 (380 pb) (figura 4 panel superior y medio respectivamente, (carriles 8 y 9), así como expresión de ARNm para el marcador endotelial CD31 (240 pb) (líneas 8 y 9 del panel inferior de la figura 4)

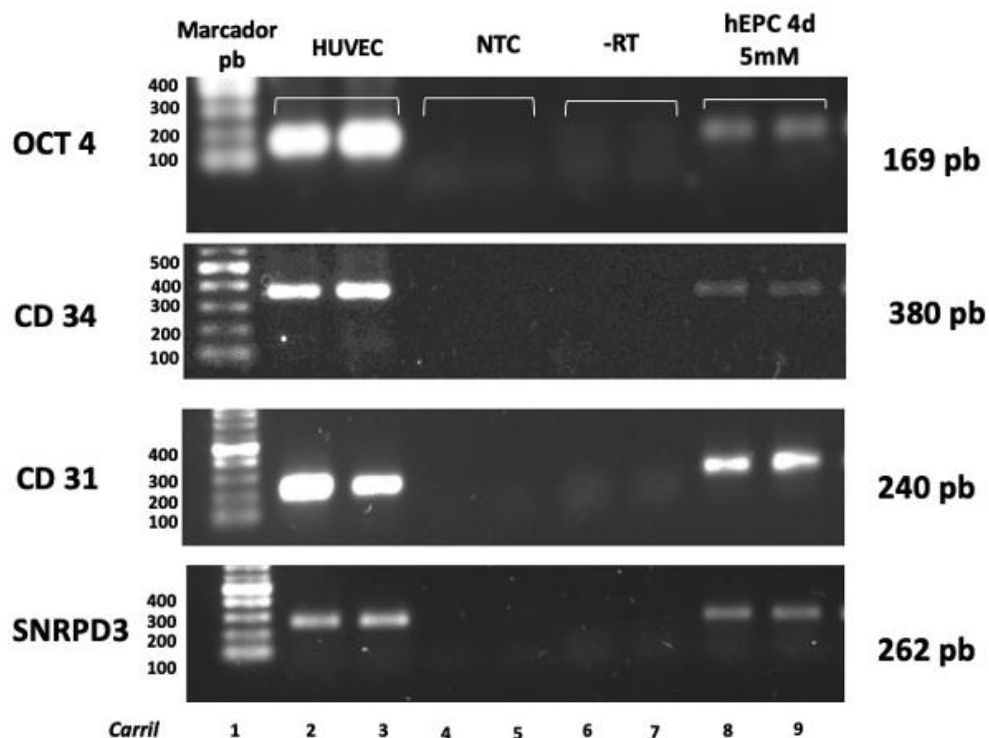


Figura 4: Marcadores de superficie hEPC a 4 días de cultivo

La presencia de ARNm para los marcadores de inmadurez Oct-4/CD34 y el marcador endotelial CD31, en hEPC cultivadas durante cuatro días con D-Glucosa 5mM, fue evaluada mediante PCR convencional y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Como control positivo de expresión se utilizó ADNc de las células HUVEC el gen *SRNPD3* fue utilizado como gen de referencia (n = 3).

Se analizó la expresión del marcador endotelial CD34 y KDR a nivel de proteína mediante citometría de flujo (Figura 5), los resultados indican la presencia de tres subpoblaciones celulares distintas, una con características de inmadurez pero sin características endoteliales ($KDR^-/CD34^+$) correspondiente al 8,7% de la población celular; una segunda subpoblación sin características de inmadurez pero con características endoteliales ($KDR^+/CD34^-$) correspondiente

al 16,7% de la población celular y una tercera subpoblación celular con características inmaduras y endoteliales (KDR⁺/CD34⁺) la cual comprende el mayor número de células dentro del cultivo, equivalente al 44% (p<0.01). Por tanto, bajo las condiciones de cultivo utilizadas, el mayor porcentaje de células presenta un inmunofenotipo inmaduro con características endoteliales.

De estos resultados es posible concluir que, a partir de nuestra metodología de cultivo primario, a los cuatro días de cultivo se obtiene principalmente hEPC identificadas como CD34⁺ OCT4⁺ CD31⁺ KDR⁺.

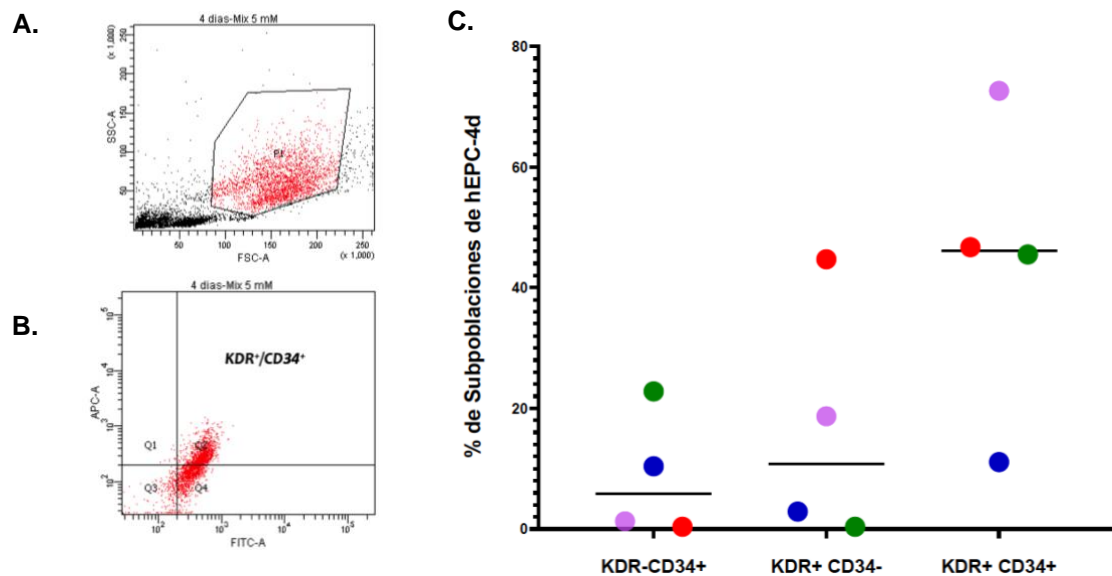


Figura 5:Caracterización Inmunofenotípica.

(A-C) La presencia de KDR y CD34 en hEPC cultivadas a 5 mM de D-glucosa se evaluó mediante citometría de flujo. Cada color representa un paciente (n=4). Los resultados se analizaron mediante test ANOVA, **p< 0,01

5.2. LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA NO AFECTAN LA IDENTIDAD DE LAS hEPC NI LA INTEGRIDAD DE SU ADN.

Con el objetivo de evaluar cómo la hiperglicemia afecta la adhesión de hEPC, fue necesario simular las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las hEPC de pacientes diabéticos. Para ello, cultivamos hEPC en medios suplementados con 5, 10, 20, 30 y 35mM de D-Glucosa.

Los resultados obtenidos indican que, en estas condiciones, la viabilidad celular es cercana al 100% (figura 6A). Aunque se puede observar una ligera disminución en los cultivos con 35mM de D-glucosa y 35mM de manitol (control osmótico) ésta no es estadísticamente significativa. Adicionalmente es importante destacar que en estas condiciones de crecimiento no se observa daño masivo en el ADN (figura 6B).

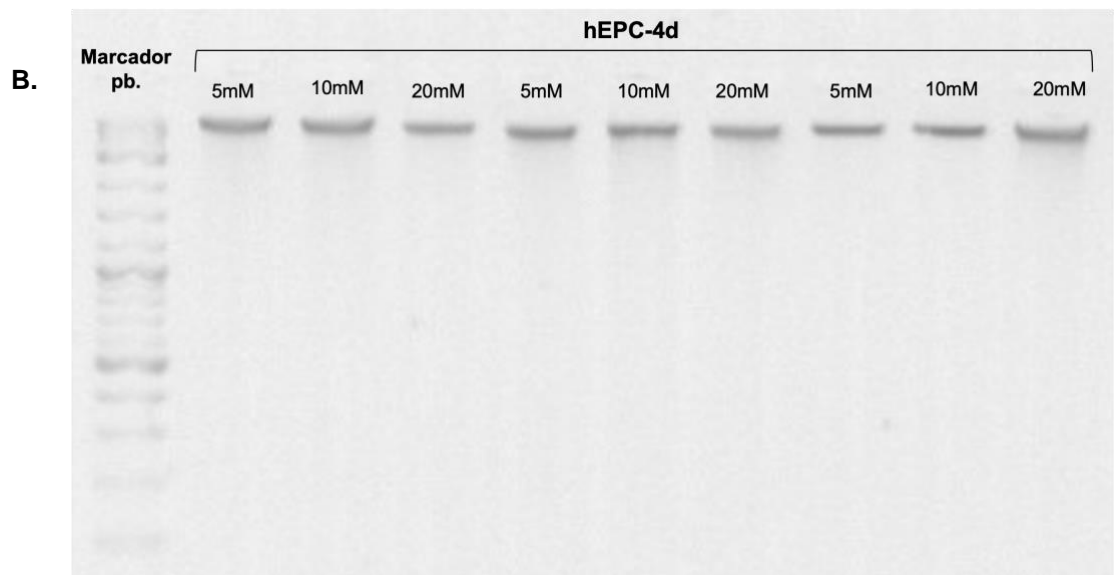
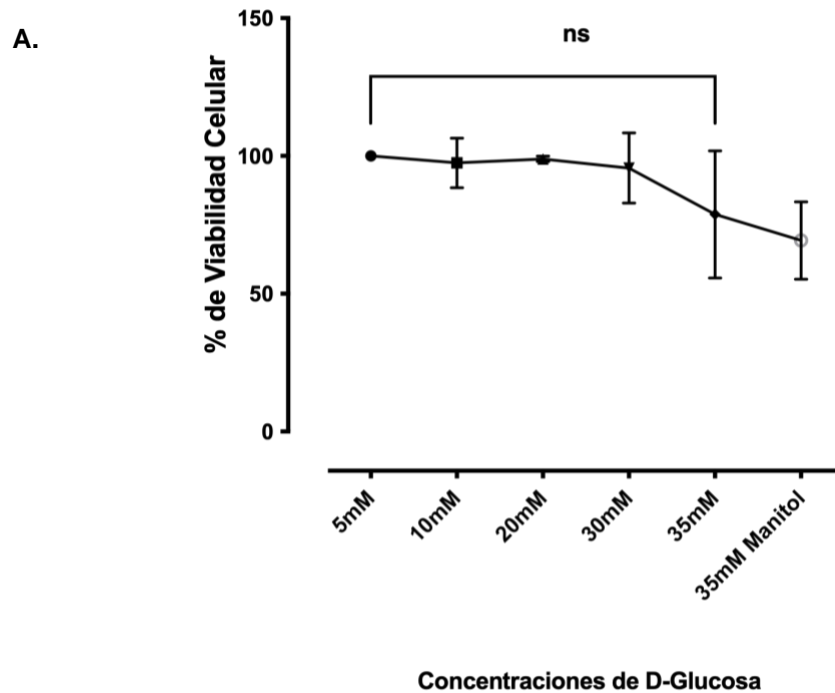


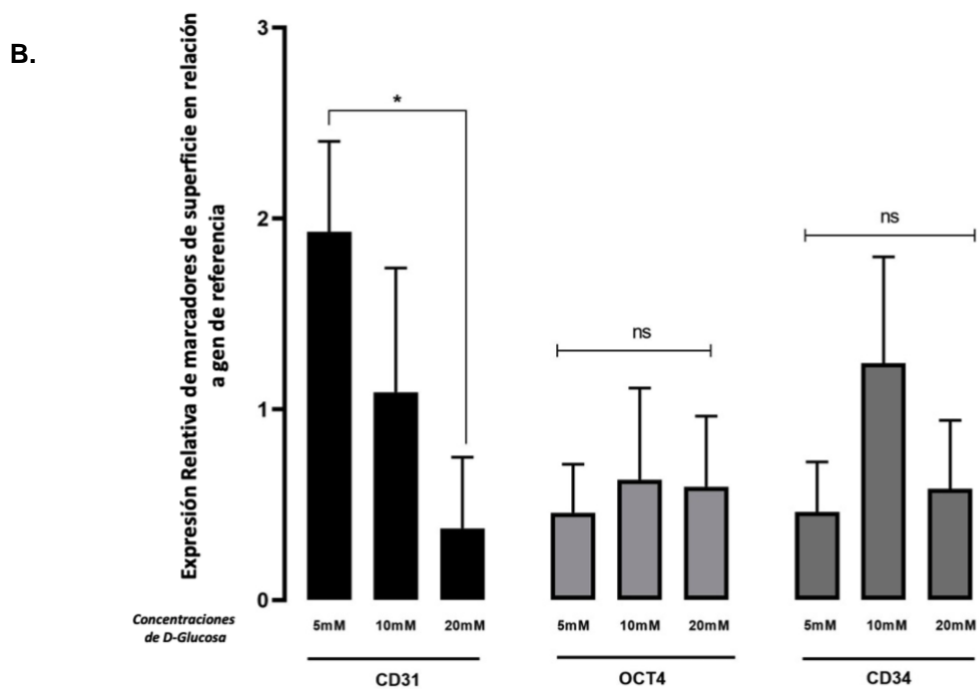
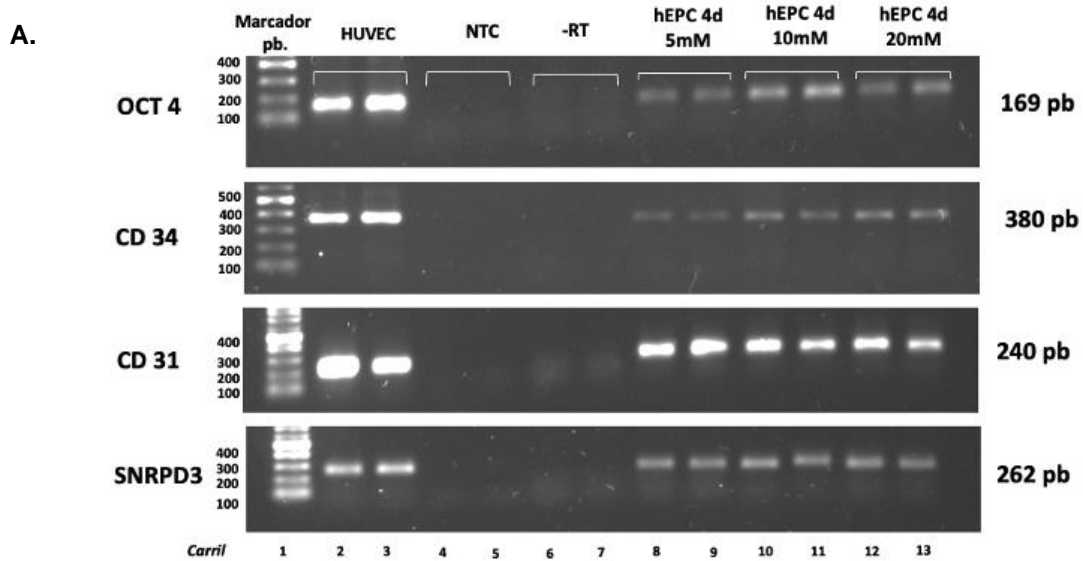
Figura 6: Viabilidad celular e integridad del ADN genómico.

En **A** se observa la evaluación de la viabilidad celular de hEPC cultivadas en diferentes concentraciones de D-glucosa (5, 10, 20, 30 y 35mM); como control osmótico fue utilizado manitol (n=4). En **B** se analizó la fragmentación masiva del ADN genómico de hEPC cultivadas en 10mM y 20mM en D-glucosa, mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando un marcador de pares de bases de 1Kb. (*ns: no estadísticamente significativo*).

En función de los resultados obtenidos, todos los experimentos siguientes se llevaron a cabo utilizando medios suplementados con 5mM (90mg/dl) como control, ya que es la concentración de D-glucosa contenida en los medios de cultivo y equivalente a la glicemia normal; 10mM (180mg/dl) correspondiente a un valor clínicamente aceptable para un paciente diabético, y 20mM de D-glucosa (360mg/dl) correspondiente al valor de hiperglicemia de un paciente con mal control glicémico.

Para caracterizar la identidad de las células que crecen en condiciones de glucosa alta, se evaluó nuevamente la expresión de los marcadores de superficie OCT4, CD34 y CD31, pero esta vez mediante qPCR. Como se observa en la figura 7A, en todas las condiciones de cultivo, las hEPC exhiben expresión de estos marcadores (carriles 8 a 13), sin embargo, al evaluar los niveles de expresión de estos marcadores, se observa en condiciones de alta D-Glucosa (20mM) una disminución estadísticamente significativa del marcador de madurez endotelial CD31, no observándose mayores cambios en los niveles de expresión de OCT-4 y CD34, Adicionalmente, como se observa en la figura 7C, el análisis de citometría de flujo de CD34 y KDR revela la presencia de las tres subpoblaciones de células descritas anteriormente: $KDR^{-}/CD34^{+}$; $KDR^{+}/CD34^{-}$; $KDR^{+}/CD34^{+}$, las cuales presentan una distribución similar en medios suplementados con D-glucosa al 5mM, 10mM o 20mM. La población de interés, $KDR^{+}/CD34^{+}$ en el cultivo a 10mM D-glucosa corresponde a un 40,3% del total de células analizadas y en el cultivo a 20mM de D-glucosa corresponde a un

40,5% del total de células analizadas, en comparación con las células cultivadas en medios suplementados con 5mM D-glucosa, en donde alcanza un porcentaje del 44%. Por lo tanto, la presencia de 10mM y 20mM de D-glucosa en el modelo de cultivo primario trabajado en este estudio, no afectan la distribución de las poblaciones celulares observadas en hEPC cultivadas en 5mM de D-Glucosa.



C.

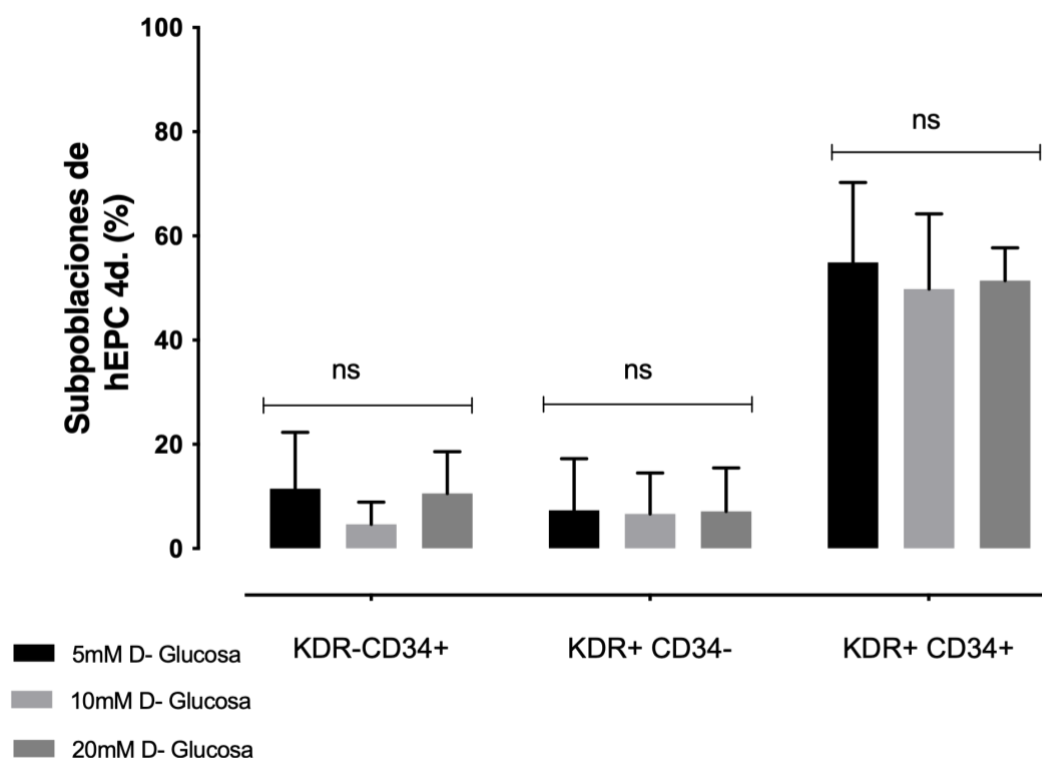


Figura 7: Caracterización hEPC en D-Glucosa

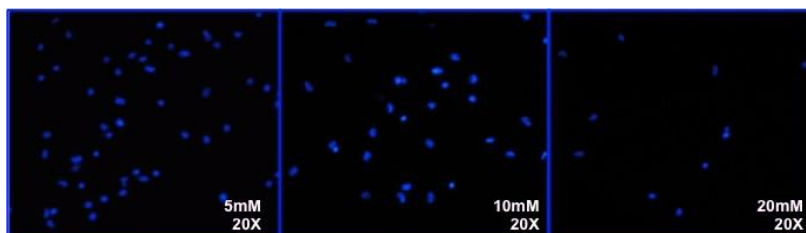
(A) La presencia de mRNA para marcador de inmadurez OCT-4/CD34 y marcador endotelial CD31, en hEPC cultivadas durante cuatro días con 5mM, 10mM y 20mM de D-Glucosa fue evaluada por qPCR y visualizada por electroforesis. (B) Los niveles expresión de los marcadores fueron evaluados mediante qPCR, utilizando ADNc de células HUVEC como control positivo, el gen *SRNPD3* se usó como gen de referencia. Los resultados fueron analizados mediante el método $\Delta\Delta Ct$ y análisis de la curva de fusión ($n = 4$). (C) La presencia de KDR, CD34 en hEPC cultivadas a 5mM, 10mM y 20mM de D-glucosa se evaluó mediante citometría de flujo ($n=4$). Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA, $**p<0,01$. (NTC: Control sin templado, -RT: Control sin enzima transcriptasa inversa).

5.3. LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA AFECTAN LA ADHESIÓN DE LAS hEPC.

Debido a que las hEPC de pacientes diabéticos muestran una capacidad de adhesión disminuida, en el siguiente experimento se evaluó si este fenómeno es reproducible *in vitro* al cultivar las células en medios suplementados con las concentraciones de D-glucosa seleccionadas.

Por lo tanto, hEPC-4d extraídas de cultivos a 5, 10 y 20mM de D-Glucosa se cultivaron sobre una matriz de fibronectina durante 4 horas, las células adheridas se contaron posteriormente mediante microscopía de fluorescencia (figura 8A). La adhesión celular se cuantificó contando las células que se adhirieron a la fibronectina en diferentes campos microscópicos. Como era de esperar, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la adhesión de las células cultivadas en 20mM de D-glucosa (figura 8B). Como resultado que cuando las células se cultivaron con 10mM de D-glucosa, no se observaron cambios en la actividad de adhesión en comparación con el control de 5mM de D-glucosa.

A.



B.

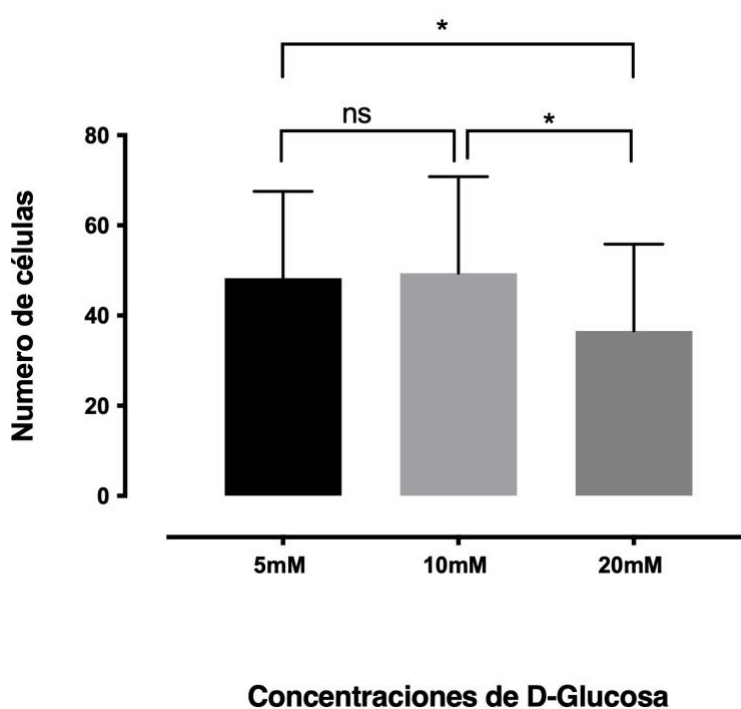


Figura 8: Altas concentraciones de D-glucosa disminuyen la adhesión de hEPC

En **(A)** se observa mediante microscopía de fluorescencia con aumento de 20x, la adhesión de hEPC cultivadas durante cuatro días a 5 mM, 10mM y 20 mM de D-glucosa a la matriz de fibronectina. Las imágenes son representativas de 5 campos por condición de cultivo ($n = 4$). En **B**, se observa el número de recuento de células de hEPC-4d cultivadas a 5mM, 10mM y 20mM de D-glucosa adheridas a la matriz de fibronectina. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA ($*p < 0,05$). (*ns: no estadísticamente significativo*).

5.4. ALTAS CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA GENERAN HIPOMETILACIÓN GLOBAL DEL ADN EN LAS hEPC.

Los resultados obtenidos indican que las hEPC-4d cultivadas en altas concentraciones de D-glucosa (20mM) presentan cambios en su capacidad de adhesión. Los mecanismos moleculares más estudiados que explican cómo el entorno desencadena cambios a nivel de expresión génica, que repercuten en la función celular, son las modificaciones epigenéticas, las cuales involucran mecanismos basados en miARN, modificaciones de histonas y cambios en la metilación del ADN.

A la fecha ha sido ampliamente documentado que las altas concentraciones de glucosa provocan daños químicos en el ADN, los cuales son reparados por diversos mecanismos enzimáticos. Sin embargo, a medida que el ADN se repara, éste va sufriendo cambios en su estado de metilación global. Considerando este hecho, se decidió evaluar si al cultivar las hEPC-4d en las concentraciones de D-Glucosa seleccionadas, se producían cambios en el ADN a nivel de metilación.

El análisis de metilación del ADN se realizó mediante slot blot utilizando un anticuerpo primario anti-ADN metilado. Como se observa en la figura 9A, el anticuerpo utilizado en este análisis sólo reconoce el ADN metilado lo que demuestra su especificidad para el reconocimiento del epítotope de 5-metilcitosina, pues no se evidencia señal del anticuerpo en la posición 6 del film

correspondiente a ADN proveniente del producto de una PCR cargado en la membrana (señal 6 panel superior e inferior respectivamente).

Como control de la técnica, se evaluó el efecto de la D-glucosa en los niveles de metilación de las células MNCs, pues la literatura señala que las altas concentraciones de D-glucosa producen hipermetilación del ADN en los leucocitos (Y. Wu, Cui, Zhang, Wu, & Yang, 2017). El ADN de las MNC fue analizado mediante slot blot, utilizando el nivel total de ADN (ADN cargado en la membrana) para estandarizar la señal del anticuerpo. Como se puede observar en la Figura 9B las MNC cultivadas en 20mM de D-glucosa se comportan de acuerdo a lo esperado, evidenciándose en su genoma una hipermetilación la cual presenta diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células cultivadas en medio suplementado con 5mM de G-Glucosa (control) ($p < 0.05$). Sin embargo, aunque las hEPC de este estudio, derivan de MNC, cuando las hEPC fueron cultivadas en 10mM y 20mM de D-Glucosa, se observó una disminución en la metilación general del genoma en comparación con el medio de control que contenía 5mM de D-Glucosa, ($p < 0,0001$) (figura 9C).

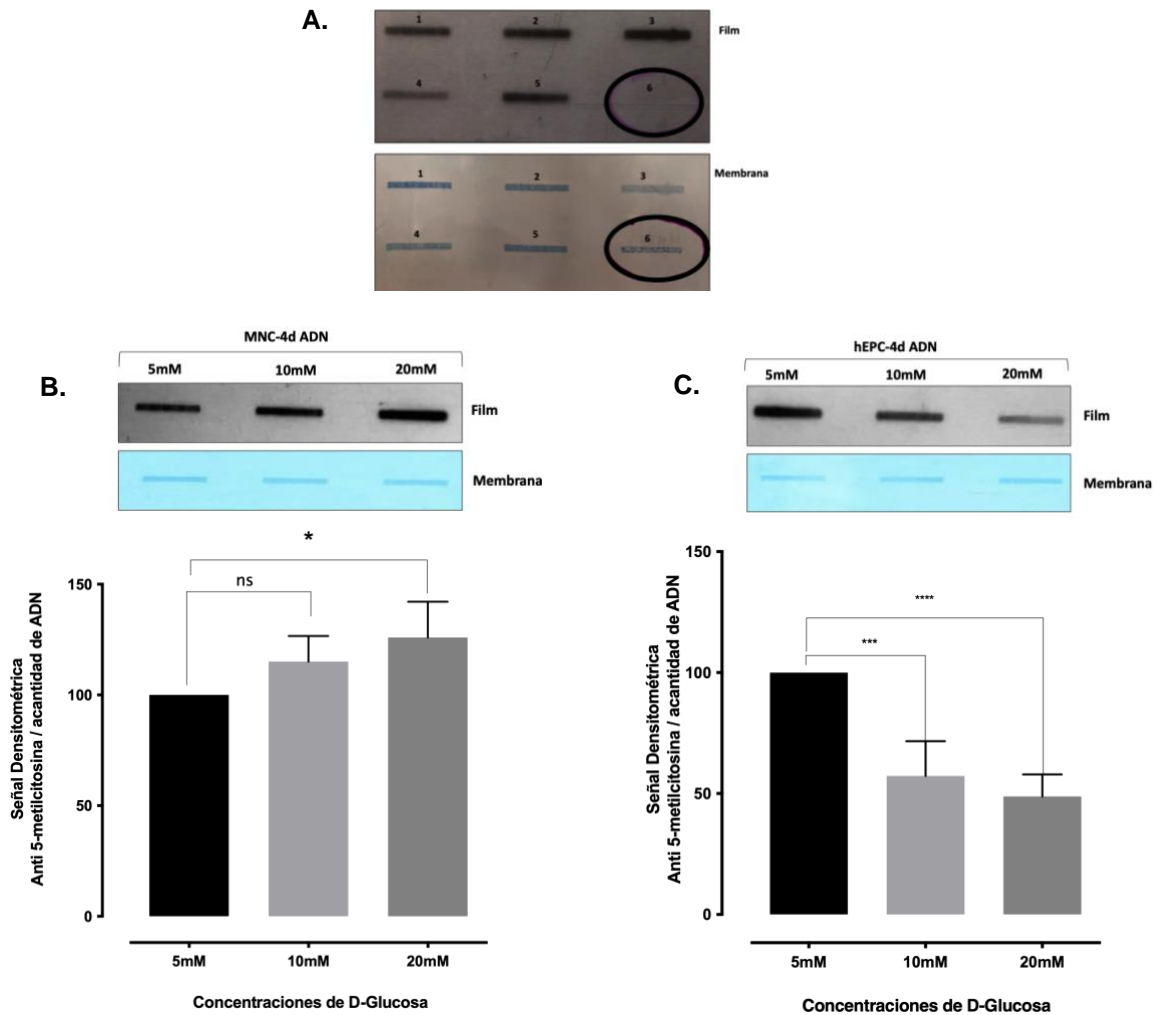


Figura 9: Las hEPC cultivadas en alta concentración de D-glucosa muestran una disminución en el porcentaje de metilación del ADN.

A) Como control de especificidad del anticuerpo primario anti-5'metilcitosina se realizó un slot blot con ADN no metilado proveniente de un producto de PCR el cual fue comparado con ADN genómico. En el panel superior se observa el film en donde las señales 1 a 5 corresponden al anticuerpo anti-5'-metilcitosina sobre ADN genómico (200ng) la posición 6 corresponde a ADN derivado de una PCR (200 ng); en el panel inferior se observa la membrana teñida con una solución de azul de metileno al 0,02% y acetato de sodio 0,2M, las marcas 1 a 5 corresponden a ADN genómico (200ng) y la marca 6 corresponde a ADN derivado de una PCR (200 ng). **(B)** Slot blot para ADN genómico de MNC y **(C)** ADN genómico de hEPC-4d cultivadas en 5mM, 10mM y 20mM de D-glucosa utilizando un anticuerpo primario anti-5'metilcitosina. El análisis densitométrico de las bandas se realizó a través del programa ImageJ (n=4). Los resultados fueron analizados mediante la prueba ANOVA. (* p<0,05), (** p <0,0001), (*** p <0,0001). (ns: no estadísticamente significativo)

5.5. LA DEMETILACIÓN DEL GENOMA DE hPEC CONDUCE A UNA MENOR ADHESIÓN CELULAR.

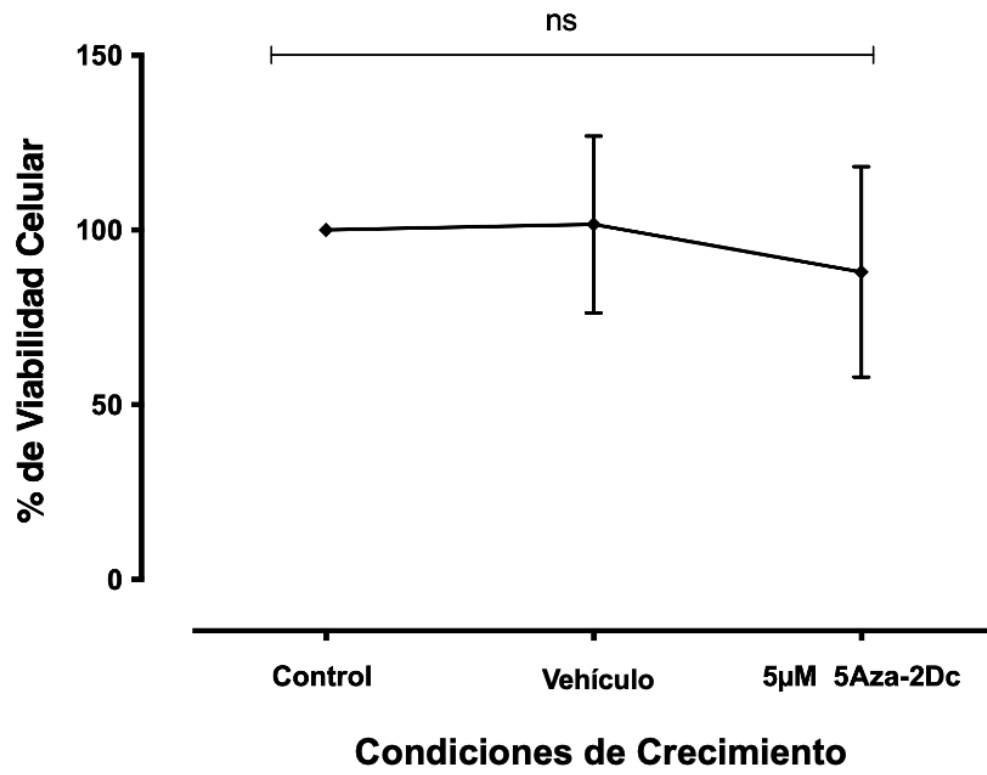
Los resultados obtenidos indican que altas concentraciones de D-glucosa *in vitro* inducen una disminución en la adhesión de hEPC-4d a la matriz de fibronectina y también causan hipometilación del genoma. Por lo tanto, para evaluar si existe una relación causal entre estos dos fenómenos, se indujo en las células hEPC-4d una demetilación del ADN independiente de D-glucosa utilizando 5-aza-2'-desoxicitidina (5 Aza-2dC).

Como resultado se obtuvo que, bajo estas condiciones de cultivo, la viabilidad celular es cercana al 100% (figura 10A) y aunque se observó una ligera disminución en los cultivos tratados con 5 Aza-2dC, ésta no es estadísticamente significativa; adicionalmente se observó que no existe daño en el ADN en estas condiciones de cultivo (figura 10B).

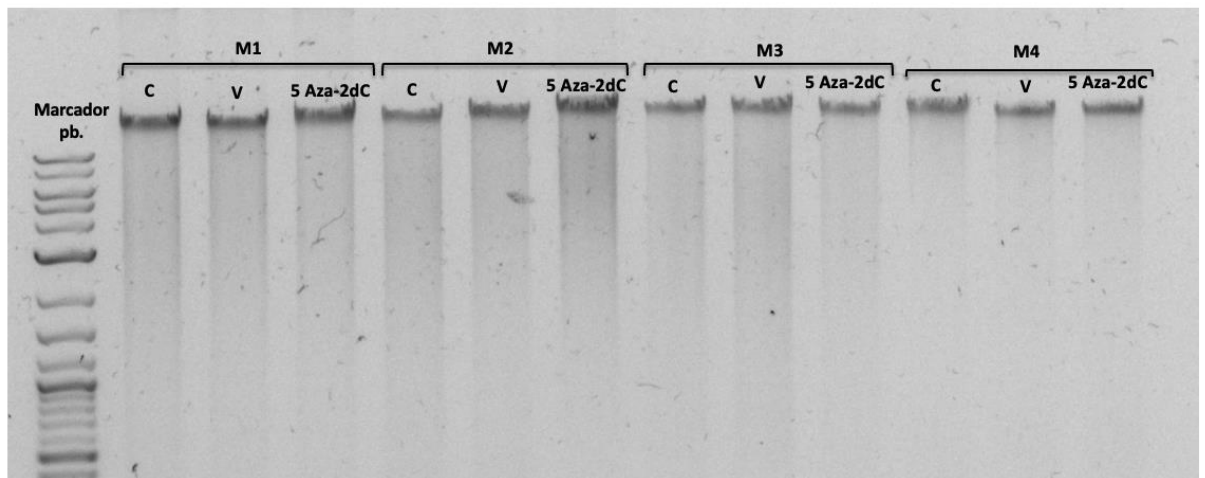
Posteriormente, para caracterizar las células cultivadas en condiciones de demetilación, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie OCT4, CD34 y CD31 y, como se ve en la figura 10C, se observaron niveles similares de ARNm de los marcadores OCT4, CD34 y CD31 para las células cultivadas con 5 Aza-2dC (carriles 10-11) y con DMSO (vehículo) (carriles 8-9).

A.

A.



B.



C.

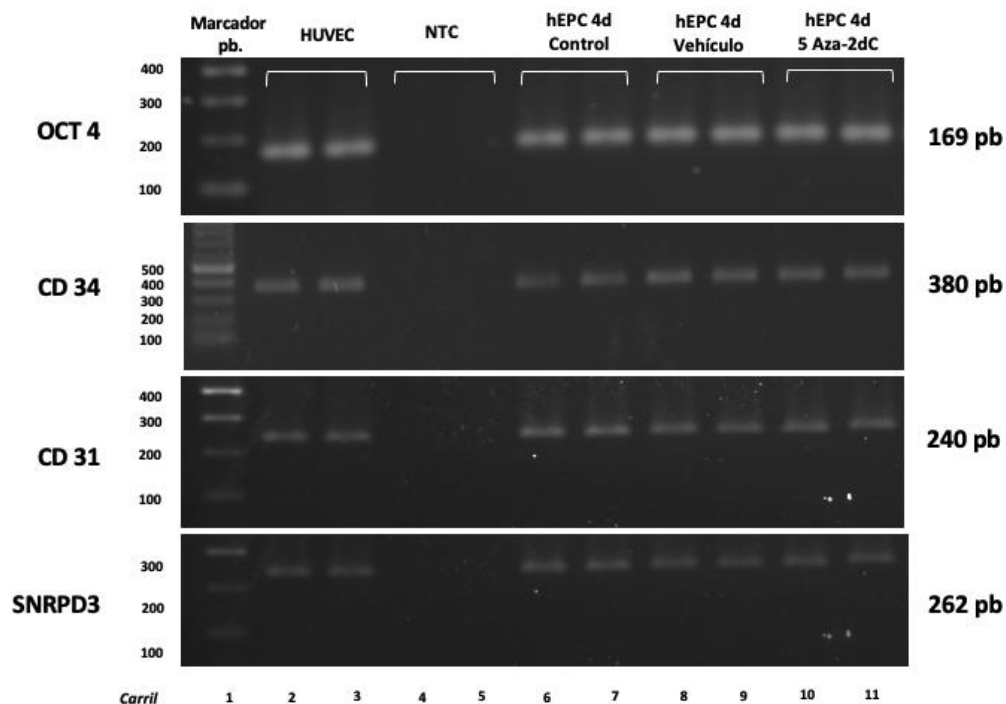
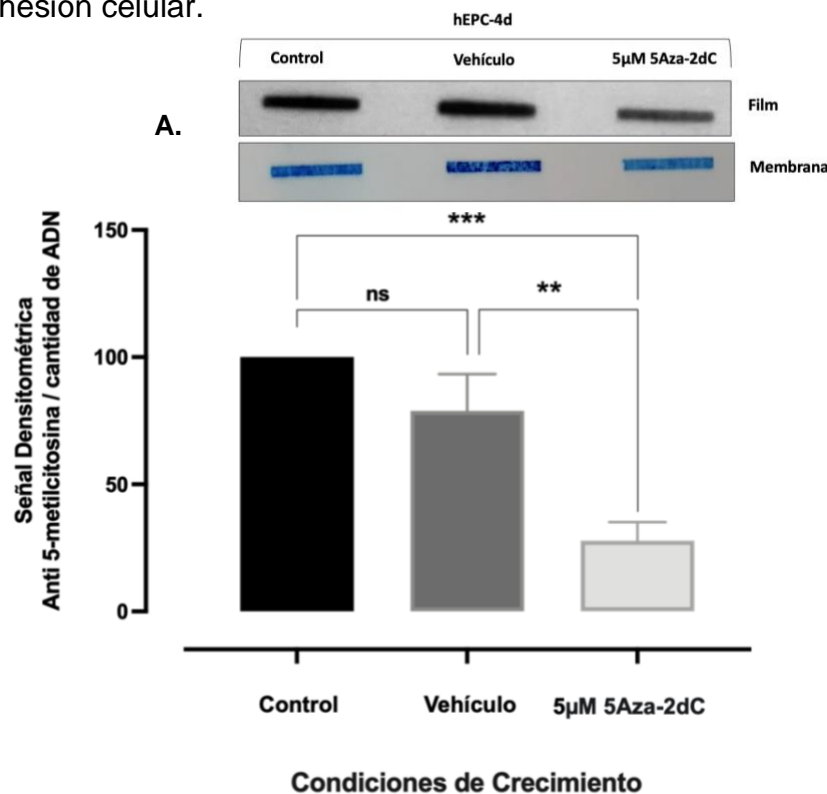


Figura 10: Análisis de viabilidad y caracterización celular de hEPC cultivadas en 5-Aza-2dC.

(A) Viabilidad celular de hEPC-4d cultivadas durante 24 horas en condiciones de control (5mM de D-Glucosa), con vehículo (DMSO) y con 5 μ M de 5-Aza-dC (M1-M4) **(B)** El análisis de fragmentación del ADN genómico de hEPC-4d cultivada durante 24 horas con 5mM de D-Glucosa, con el vehículo y con 5 μ M 5-Aza-dC se analizó mediante electroforesis (M1-M4). **(C)** La expresión del ARNm para los marcadores de inmadurez Oct-4 y CD34 y el marcador endotelial CD31 en hEPC-4d cultivadas durante 24 horas con 5mM de D-Glucosa (hEPC-4d control), en vehículo y 5 μ M 5-Aza-dC fue evaluado por PCR convencional y visualizado por electroforesis. Como control positivo de expresión se utilizó ADNc de células HUVEC y el gen *SNRPD3* fue utilizado como control de carga (n = 4). (NTC: Control sin templado, M: muestra, C: control, V: vehículo, 5Aza-2dC: agente demetilante 5-aza-2'deoxyцитидина).

Como era de esperar, 5 Aza-2dC induce una hipometilación estadísticamente significativa en el genoma de hEPC en comparación con el control ($p < 0,001$) y el vehículo ($p < 0,01$) (figura 11A). Como se puede apreciar en la figura 10B, la adhesión de hEPC a la matriz de fibronectina de las células tratadas con 5 Aza-2dC, evaluada mediante la cuantificación de diferentes campos microscópicos de las células adheridas a la fibronectina, fue menor en comparación con el vehículo y el control (panel central y panel izquierdo respectivamente); observándose una disminución estadísticamente significativa en las células cultivadas con 5 Aza-2dC ($p > 0.001$) en comparación con el control y el vehículo (figura 11C). Por lo tanto, estos resultados indican que la hipometilación global del ADN de hEPC genera una disminución de la capacidad de adhesión celular.



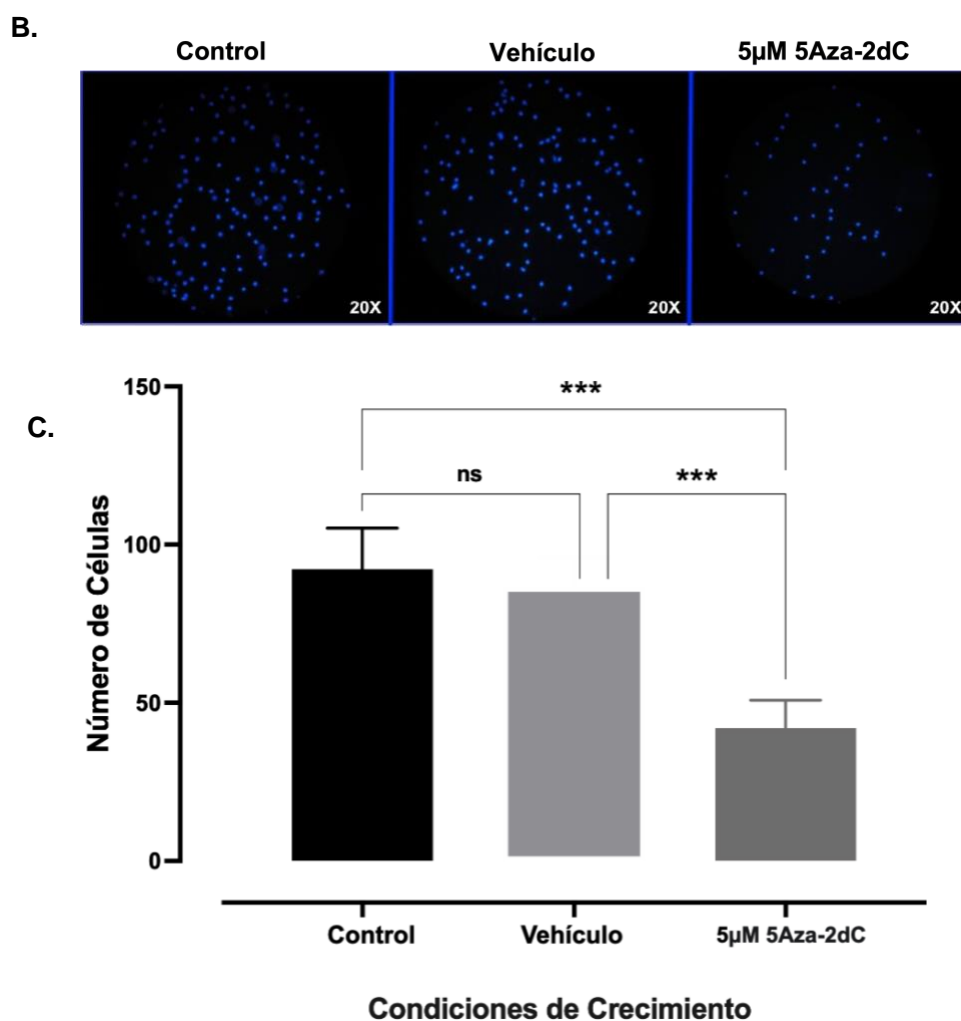


Figura 11: La disminución de la adhesión de hEPC está relacionada con la hipometilación global del genoma.

(A) La presencia de 5'metilcitosina en ADN genómico de hEPC-4d cultivadas durante 24 horas con 5mM de D-glucosa, con el vehículo y con 5µM de 5-Aza-dC, fue evaluada mediante slot blot utilizando un anticuerpo primario anti-5'metilcitosina. El análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el programa ImageJ (n= 4). **(B)** La adhesión de las hEPC-4d cultivadas durante 24 horas con 5mM de D-glucosa, con el vehículo y con 5-Aza-dC 5µM a la matriz de fibronectina, se muestran con un aumento de 20x mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes son representativas de 5 campos por condición de cultivo (n = 4). **(C)** Recuento de células de hEPC cultivadas durante 24 horas con 5mM de D-glucosa, con el vehículo y con 5-Aza-dC 5µM (n = 4). Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA. (** p<0,01), (***) p<0,001). (ns: No estadísticamente significativo, 5Aza-2dC: agente demetilante 5-aza-2'deoxytidina).

5.6. LA ALTA D-GLUCOSA PRODUCE DEMETILACIÓN ACTIVA DEL GENOMA DE hEPC:

Los resultados obtenidos indican que al cultivar las hEPC-4d en alta concentración de D-glucosa se produce una hipometilación en su ADN. Para confirmar que este efecto es generado por el metabolismo de D-glucosa y no por un efecto osmótico, las células se cultivaron en medios suplementados con 10mM y 20mM de L- Glucosa (no metabolizable). Como se observa en la figura 12A, el porcentaje de metilación del ADN de hEPC cultivadas en 20mM de L- Glucosa no presenta cambios estadísticamente significativos en comparación con el control (5mM de D-Glucosa). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la Glucosa debe metabolizarse (D-Glucosa) para inducir la hipometilación en el ADN de hEPC.

Anteriormente se ha demostrado que el proceso de reparación del ADN dañado por el metabolismo de glucosa puede conducir a la hipometilación del genoma por acción de las enzimas TET1 y TET2, las cuales transforman la 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC). Por lo tanto, para evaluar si ocurre hipometilación del ADN de hEPC como resultado de las actividades de reparación del ADN, se midieron mediante slot blot, los niveles de 5-hmC en células cultivadas con diferentes concentraciones de D-Glucosa. Como se observa en la figura 12B, al cultivar las células con 20mM de D-glucosa se genera un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los niveles de 5-hmC en

comparación con el control (células cultivadas en 5mM de D-Glucosa) y una tendencia creciente al cultivar las células con 10mM de D-Glucosa.

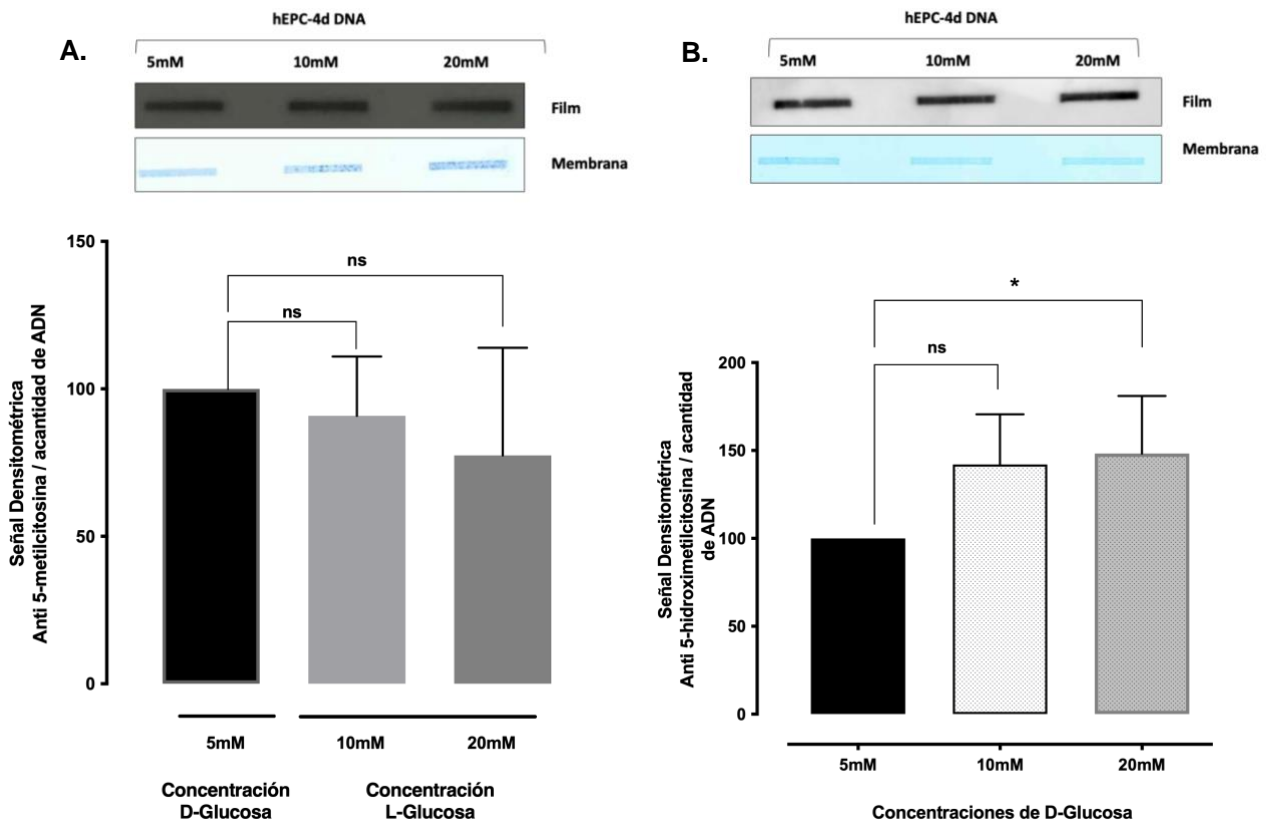
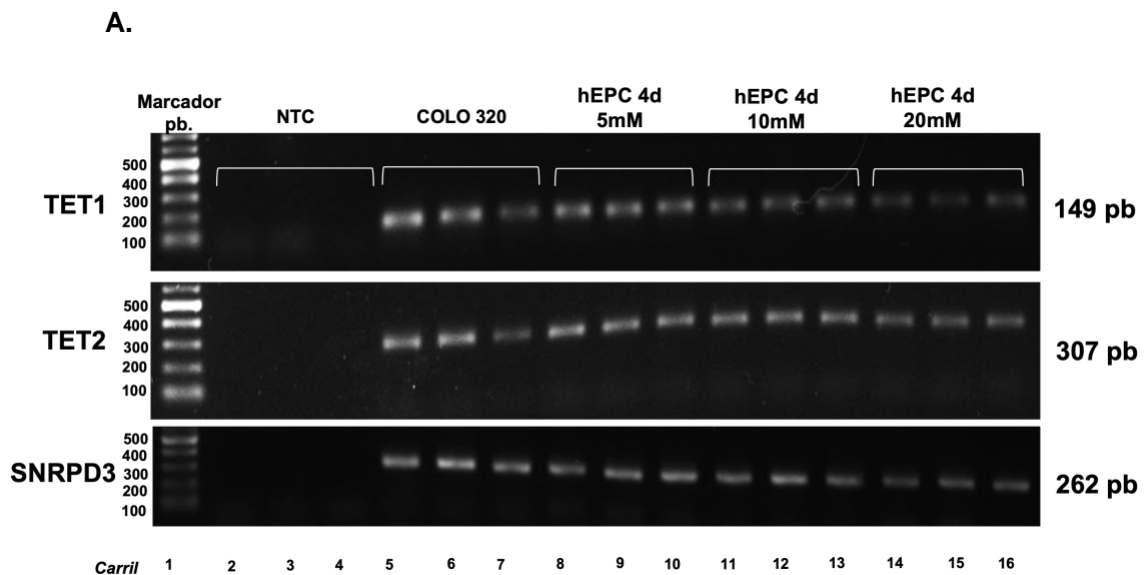


Figura 12: La hipometilación de las hEPC en alta D-glucosa es por efecto metabólico y genera 5-hidroximetilcitosina.

(A) Slot blot para ADN genómico de hEPC-4d cultivadas en medios suplementados con 5mM de D-glucosa, 10mM o 20mM de L-Glucosa. Como anticuerpo primario fue utilizado el anticuerpo anti-5'metilcitosina (n = 3). (B) Slot blot para ADN genómico de hEPC cultivadas en 5mM, 10mM y 20mM de D-Glucosa, como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo anti-5' hidroximetilcitosina (n=4). Todos los análisis densitométricos de las bandas se realizaron través del programa ImageJ. Los resultados fueron analizados por la prueba ANOVA (* p<0,05), (ns: no estadísticamente significativo).

Curiosamente, aunque se observa la expresión de los genes *TET1* y *TET2* en las tres condiciones de cultivo (5, 10 y 20mM de D-glucosa) (figura 13A carriles 8 a 16), no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión del ARN mensajero para los genes *TET1* y *TET2* en las distintas condiciones estudiadas (figuras 13B a 13E). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la hipometilación del genoma hEPC observada cuando las células se cultivan en altas concentraciones de D-Glucosa es independiente de los niveles de expresión de los genes *TET1* y *TET2*.



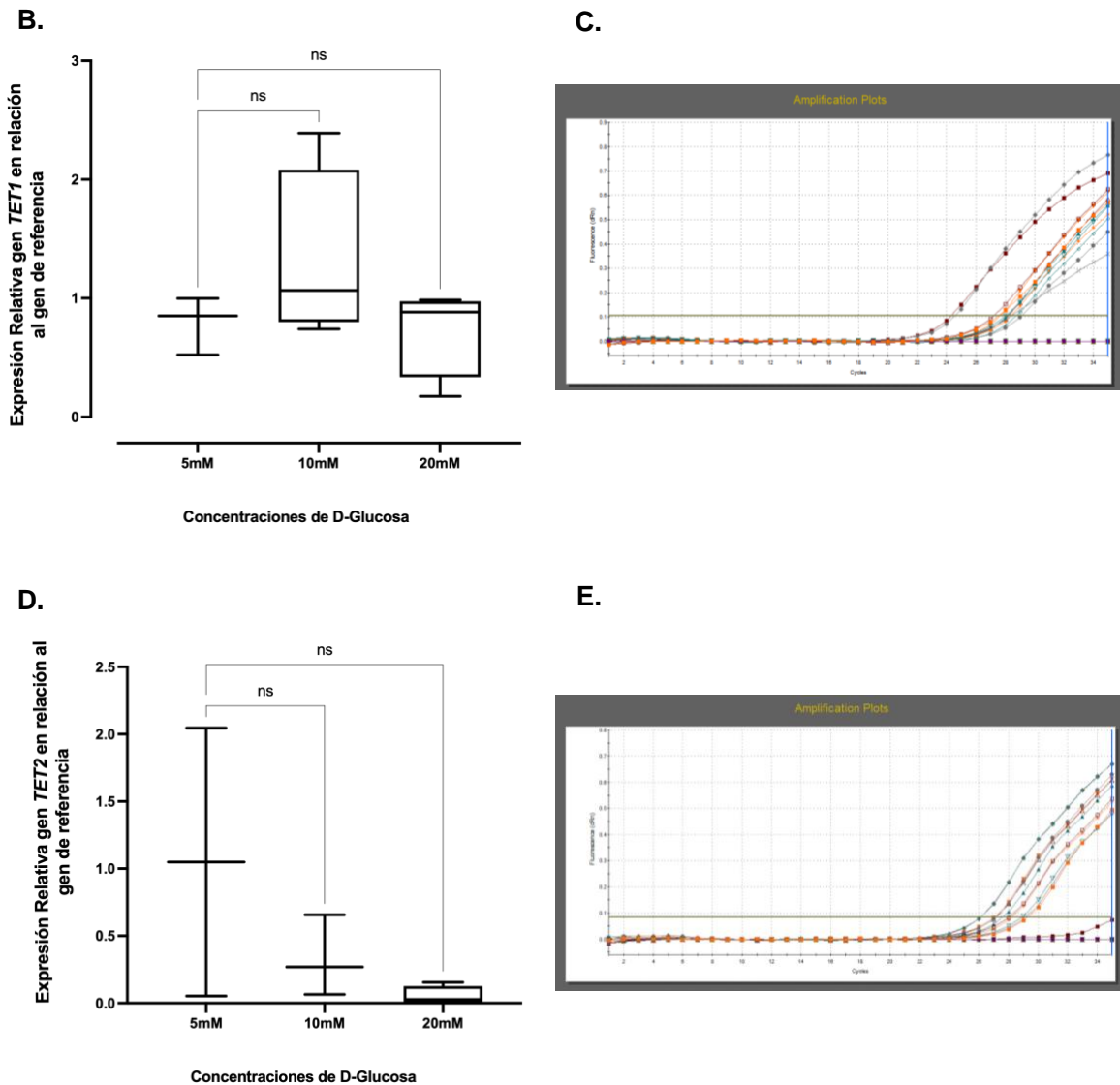


Figura 13: Alta D-Glucosa no aumenta los niveles de expresión del ARNm de las enzimas *TET1* y *TET2*.

(A) La presencia de ARNm para los genes *TET1* y *TET2* en hEPC cultivadas durante cuatro días con 5mM, 10mM y 20mM de D-Glucosa, se evaluó mediante qPCR y fue visualizada mediante electroforesis. Como control positivo de expresión fue utilizado ADNc de células COLO320, y como control de carga el gen *SNRPD3* (n=3). Los niveles de expresión de ARNm para los genes *TET1* (B y C) y *TET2* (C y D) de las hEPC cultivadas con 5mM, 10mM y 20mM de D-glucosa, se evaluaron a través qPCR, y los resultados se analizaron mediante el método $\Delta\Delta C_t$ y análisis de la curva de fusión. Como control positivo de expresión, se usó nuevamente ADNc de células COLO320 y el gen *SNRPD3* se utilizó como gen de referencia (n=4). Los resultados fueron analizados por la prueba ANOVA (NTC: Control sin templado; ns: no estadísticamente significativo).

6. DISCUSIÓN:

6.1. hEPC Y DIABETES:

La incidencia y prevalencia de Diabetes tipo 2 aumentan cada año y, por ende, las complicaciones micro y macro vasculares asociadas a la misma. Sin embargo, las evidencias que respaldan el rol de la epigenética, específicamente, cambios en los patrones de metilación a nivel vascular, en el desarrollo de las complicaciones derivadas de esta enfermedad siguen siendo limitadas. Adicionalmente, la alteración en las funciones angiogénicas de las hEPC en pacientes diabéticos y la escasa corrección de estas funciones pese a mantener un control glicémico adecuado clínicamente, indican que el ambiente hiperglicémico en los pacientes diabéticos, juega un rol fundamental en la biología de las hEPC.

Por lo tanto, con el objetivo de evaluar cómo, las altas concentraciones de glucosa afectan el perfil de metilación global del ADN de hEPC y el impacto que este fenómeno tiene en la propiedad de adhesión celular, en el siguiente estudio se utilizaron hEPC (KDR⁺/ CD34⁺) aisladas de pacientes sanos las cuales fueron sometidas a concentraciones de D-glucosa normal (5mM) y alta D-glucosa (10mM y 20mM) durante cuatros días, para posteriormente estudiar su perfil de metilación y su capacidad de adhesión.

6.2. D-GLUCOSA AFECTA LA MADURACIÓN Y ADHESIÓN DE hEPC:

Debido a que el control glicémico es un pilar fundamental en la prevención de las complicaciones derivadas de la DM2 (Henning, 2018), en el presente estudio se simularon tres ambientes a los cuales las hEPC se pueden ver enfrentadas en el organismo: se utilizó la concentración de 5mM de D-glucosa (90mg/dl) como valor de glicemia normal, 10mM de D-glucosa (180mg/dl) el cual corresponde a un valor de glicemia clínicamente aceptable para un paciente diabético, y 20mM de D-glucosa (360mg/dl) correspondiente al valor de glicemia en un paciente con mal control de niveles de glucosa plasmática. Los resultados arrojaron que las altas concentraciones de D-Glucosa (10mM y 20mM) no generan una fragmentación masiva del ADN, ni alteran la viabilidad celular o el inmunofenotipo de hEPC (figuras 6 y 7). Sin embargo, como se observa en la figura 7B, aunque la identidad celular se mantiene en estas condiciones, pues se evidencia expresión de las moléculas de superficie celular CD31, OCT-4 y CD34 en el gel de agarosa, al cuantificar los resultados obtenidos de la qPCR mediante el método del $\Delta\Delta C_t$, se observa que las altas concentraciones de D-Glucosa (20mM) producen una disminución estadísticamente significativa del marcador de superficie CD31 ($p < 0,01$) en comparación con el control (5mM), no observándose mayores cambios en los niveles de expresión de marcadores de inmadurez celular OCT-4 y CD34. Estos resultados son concordantes con lo publicado por Marcchenti el año 2006, quien publicó que célula mononucleares

provenientes de donantes sanos y diferenciadas a hEPC en presencia de 33mM de D-Glucosa, presentaban una disminución en la expresión de los marcadores de superficie endotelial CD31 y KDR, fenómeno asociado al aumento en la actividad de la vía PI3K/AKT/FOXO3 (Marchetti et al., 2006), pues el factor de transcripción FOXO3 al ser fosforilado por AKT, es secuestrado en el citoplasma por la chaperonas moleculares 14-3-3 (Hosaka et al., 2004), impidiendo la activación de la transcripción de los genes *CD31* y *KDR*. Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que esta disminución en los niveles de expresión del gen de CD31 se presentan en concentraciones más bajas de D-Glucosa (20mM) a las estudiadas por el grupo de investigación de Marchenti (33mM). Adicionalmente es importante destacar que, si bien al cultivar las hEPC a 10mM de D-Glucosa, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de CD31 en comparación con el control de 5mM, la tendencia a la disminución en la expresión es evidente, por lo tanto, a la luz de estos resultados, es pertinente indicar que la concentración de 180mg/dl de glucosa plasmática, considerada como un valor de glicemia clínicamente aceptable, podría estar afectando el grado de maduración y diferenciación celular de las hEPC (Kang et al., 2017).

Adicionalmente a estos resultados se observa que la concentración de 20mM de D-Glucosa genera una disminución en la capacidad de adhesión de estas células a una matriz de fibronectina, en comparación con las células cultivadas en 10mM o 5mM de D-Glucosa (control) (figura 8A y 8B). Estos resultados son

concordantes con un estudio publicado en el año 2016 por el grupo de investigación de Chen, quienes aislaron hEPC desde MNC cultivadas por siete días con 25mM de D-Glucosa para luego montarlas sobre una capa de células HUVECs. Transcurridas 24 horas del cultivo, los autores observaron una disminución de aproximadamente un 20% en la adhesión de las células tratadas con 25mM de D-Glucosa en comparación con el control ($p < 0,001$). Demostrando de esta forma, al igual que en esta investigación, que el ambiente de alta D-Glucosa afecta la capacidad de adhesión de hEPC (Tseng et al., 2016). Este fenómeno de alteración en la capacidad adhesiva de las hEPC ha sido observado también en ratones diabéticos con dislipidemia, los cuales muestran una adhesión disminuida, la cual se hace más evidente a los 4 y 7 días después de la inducción de diabetes (Filippi et al., 2020). Por lo tanto, independientemente de la especie, es posible sugerir que el ambiente hiperglicémico juega un papel relevante en la función adhesiva de las EPC y aparentemente en el proceso de maduración celular. Los resultados obtenidos en los experimentos de adhesión pudiesen estar relacionados con la disminución en la expresión de CD31 a 20mM de D-Glucosa, pues esta disminución se traduce en una alteración de la maduración celular afectando las funciones de estas células, entre ellas la adhesión.

6.3. ALTA D-GLUCOSA GENERA HIPOMETILACIÓN GLOBAL EN EL ADN DE hEPC:

Con relación al perfil de metilación de las hEPC bajo las condiciones estudiadas, los resultados obtenidos, indican que el ambiente hiperglicémico de 10mM y 20mM de D-Glucosa en el cual se cultivaron las hEPC, genera como resultado una disminución en la metilación global del genoma, en comparación con el control de 5mM de D-Glucosa (figura 9C), destacando así la importancia de mantener un buen control glicémico. Sin embargo, aunque se observan cambios en la metilación del ADN a los cuatro días de cultivo con 10mM de D-Glucosa (figura 9C), interesantemente la adhesión celular no se ve afectada al cultivar las células en estas condiciones (figura 8B).

Con relación a los cambios del estado de metilación en DM2, diferentes informes han demostrado que esta patología cursa con hipermetilación de genes específicos de mastocitos, células de músculo esquelético, células de la retina, entre otras (Fu, Zhao, He, & Feng, 2020; Gong et al., 2014; Tewari, Zhong, Santos, & Kowluru, 2012). Sin embargo, el estado de metilación de los genes en el contexto de diabetes mellitus tipo 2 pareciera depender de las células estudiadas, ya que en el año 2014, el grupo de investigación de Dayeh analizó 1649 sitios CpG , correspondientes a 853 genes, en el genoma de células beta pancreáticas aisladas de pacientes con DM2, observando una disminución del porcentaje de metilación gen específica en las regiones CpG estudiadas en

comparación con los pacientes control (97%) (Dayeh et al., 2014). Resultados similares fueron reportados por Nilsson y colaboradores quienes trabajaron con 251 sitios CpG correspondientes a 162 genes, del genoma de hepatocitos de pacientes diabéticos tipo 2. Sus resultados arrojaron una disminución en el porcentaje de metilación gen específica de las regiones estudiadas en comparación a los pacientes no diabéticos (94%) (Nilsson et al., 2015). A nivel global del genoma, se ha observado que al extraer ADN genómico desde glóbulos blancos provenientes de pacientes diabéticos y pacientes controles, los primeros presentan una disminución en el porcentaje de 5mC y un aumento en los niveles de 5hmC y 5caC, resultados concordantes con lo observado en este estudio al cultivar las hEPC en 10mM y 20mM de D-Glucosa (Yuan et al., 2019; Zampieri et al., 2021), por lo tanto, a la luz de la evidencia existente en la literatura y de los resultados obtenidos en esta investigación es factible indicar que en diabetes mellitus tipo 2 puede presentarse una hiper o hipo metilación gen específica y una hipometilación global.

Adicionalmente, una de las características de DM2, debido a la elevada tasa de oxidación de glucosa o lípidos en el ciclo de Krebs, es el aumento del estrés oxidativo, generado por el paso excesivo de electrones en la cadena de transporte de electrones (Brownlee, 2001). Experimentalmente se ha observado que el estrés oxidativo presente en pacientes diabéticos tipo 2, afecta la propiedad de reendotelización de las hEPC (Sorrentino et al., 2007). Del mismo modo, la proliferación celular, el reclutamiento de estas células y su función de

adhesión en las áreas de lesión vascular, se ven afectadas en estas condiciones (Chen et al., 2007; Hamed et al., 2009; Sambuceti et al., 2009).

Como ha sido ampliamente publicado, el estrés oxidativo induce roturas en el ADN (Garcia Soriano F et al., 2001); cuya reparación puede cambiar el estado de metilación del ADN celular (Dhliwayo et al., 2014). En esta misma línea, la metilación del ADN juega un papel central en la expresión génica y, por tanto, en la función celular, existiendo un vínculo entre diabetes, estado de metilación del ADN y función celular (Ouni et al., 2020; Parveen & Dhawan, 2021; Pinzón-Cortés et al., 2017; Yuan et al., 2019). En este contexto, los resultados obtenidos confirman esta hipótesis, ya que cuando se indujo demetilación en el ADN de las hEPC de manera independiente de D-glucosa (figura 11A), la adhesión de las células disminuyó en comparación con las células no tratadas (figura 11B y 11C). Por lo tanto, considerando los antecedentes de la literatura y los resultados obtenidos, es posible sugerir que la alteración en la función adhesiva de las hEPC-4d es debido en parte, a la hipometilación del genoma producto de las altas concentraciones D-Glucosa presentes en el medio de cultivo.

El fenómeno de hipometilación observado en altas concentraciones de D-glucosa pudiese deberse a una consecuencia de los procesos de reparación del ADN frente al estrés oxidativo inducidos por glucosa, a través de la hidroxilación de la metilcitosina, dando lugar a la 5hmC, evento que constituye más del 90% en la reducción de la metilación de la citosina (Unnikrishnan et al., 2019; Q. Wu & Ni, 2015).

6.3. HIPOMETILACIÓN DEL GENOMA INDEPENDIENTE DEL AUMENTO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES TET:

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la hipometilación en el ADN de hEPC fue causada por el metabolismo de D-glucosa y no por un efecto osmótico (figura 12A). Además, se observó una tendencia creciente en la señal de 5hmC al cultivar las hEPC con 10mM de D-Glucosa la cual se tornó estadísticamente significativa a 20mM ($p < 0,05$) (figura 12B). Esto sugiere que la alta concentración de D-glucosa podría estar produciendo estrés oxidativo que estimula la oxidación del ADN, lo que se evidencia por la presencia de 5hmC. En concordancia con los resultados obtenidos, se ha observado en células de sangre periférica un aumento significativo en los niveles de hidroximetilación del ADN genómico proveniente de pacientes diabéticos mal controlados en comparación con los pacientes bien controlados ($p < 0,015$), siendo aún más notoria la diferencia al realizar la comparación con el grupo control ($p < 0,002$) (Pinzón-Cortés et al., 2017). Por lo tanto, una alta concentración de D-glucosa puede generar un cambio dinámico en la proporción de 5mC y 5hmC en células circulantes como lo son las hEPC.

Como se ha comentado, la oxidación de 5mC a 5hmC es llevada a cabo por las enzimas TET, sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que el aumento en los niveles de 5hmC aparentemente, no se asocian a cambios en los niveles de expresión del ARN mensajero para los genes *TET1* o *TET2* en las hEPC cultivadas por cuatros días a 10mM y 20mM de D-Glucosa en

comparación con el control (5mM) (figura 13B a 13E). Estos resultados contrastan con lo publicado por el grupo de investigación de Yuan, quienes evaluaron los niveles de expresión de los genes *TET2* y *TET3*, además de cuantificar los niveles globales de 5mC y 5hmC en el ADN leucocitario de pacientes con DM2 y controles sanos, observando un aumento estadísticamente significativo en los niveles de 5hmC y en la expresión de ARNm de estas enzimas en los pacientes diabéticos ($p < 0,001$), demostrando que la hiperglicemia estimula la expresión de los genes *TET*, generando la oxidación de 5mC a 5hmC.

Sin embargo, es importante considerar que la expresión de las enzimas TET también puede ser regulada a nivel postraduccional. De hecho, se ha observado que la proteína IDAX (o CXXC4) puede interactuar con el dominio catalítico de TET2 disminuyendo los niveles de esta enzima a través de la degradación mediada por caspasas (Ko et al., 2013). También se ha demostrado que las proteínas TET están sujetas a una variedad de modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la O-GlcNAcilación en el extremo N terminal (Bauer et al., 2015). Por lo tanto, la actividad de las enzimas TET no sólo puede regularse a nivel del ARN mensajero, sino que también puede regularse a través de modificaciones postraduccionales, siendo posible que, en las hEPC-4d sometidas a diferentes condiciones glicémicas, estas enzimas estén siendo reguladas por algún mecanismo postraduccional. Esta teoría es respaldada por los resultados presentados el año 2018 por Wu y colaboradores, quienes examinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con

espectrometría de masas, los niveles globales de 5hmC en ADN de MNC de sangre periférica provenientes de pacientes sanos y pacientes diabéticos, observando que el aumento de los niveles de glucosa, impide la fosforilación mediada por AMPK, de la serina 99 de TET2, provocando la desestabilización de esta enzima seguida de una desregulación en los niveles de 5hmC (D. Wu et al., 2018). Otra modificación postraduccional observada en TET2 corresponde a la acetilación de ésta en la posición K111 vía p300. Dicha modificación incrementa la actividad de la enzima ya que la estabiliza, aumento la oxidación de 5mC a 5hmC (Y. W. Zhang et al., 2017).

De manera paralela, es importante considerar que estos resultados no son aislados, ya que como se comentó en un inicio, las concentraciones de D-Glucosa trabajadas en este estudio no generan una fragmentación masiva en el ADN (figura 6B), por lo tanto, es probable que bajo las condiciones de cultivo trabajadas, la hipometilación global del genoma de las hEPC no esté siendo producida por los mecanismos de reparación asociados a fragmentación del ADN, sino por mecanismos asociados directamente al daño oxidativo producido por ROS en las bases nitrogenadas. En efecto, ha sido previamente descrito que la lesión oxidativa 8-oxoG influye negativamente en la metilación de la citosina, afectando la metilación de sitios adyacentes, resultando en hipometilación del genoma (Weitzman, Turk, Milkowski, & Kozlowski, 1994). Esta demetilación se debe a que la presencia de 8-oxoG en el ADN es reparada por la enzima ADN

Glicosilasa (OGG1) la cual interactúa y recluta a TET1 a la lesión 8-oxoG oxidando las 5mC adyacentes a dicha lesión (Zhou et al., 2016).

En conclusión, como resultado de este estudio se puede indicar que las Células Progenitoras de Endotelio Humano cultivadas en 10mM y 20mM de D-Glucosa son viables y mantienen su identidad celular, sin embargo, estas condiciones de cultivo generan los siguientes efectos en las células: 1) disminución en los niveles de expresión del gen del marcador de superficie CD31 a una concentración de 20mM de D-Glucosa, 2) hipometilación activa del genoma de las hEPC a 10mM y 20mM de D-Glucosa, fenómeno que de acuerdo a los resultados obtenidos, aparentemente es independiente de los niveles de expresión de los genes de las enzimas TET1 y TET2 y finalmente 3) disminución en la capacidad de adhesión de las hEPC a una capa de fibronectina a la concentración de 20mM de D-Glucosa, proceso asociado al estado de metilación de las células (figura 14).

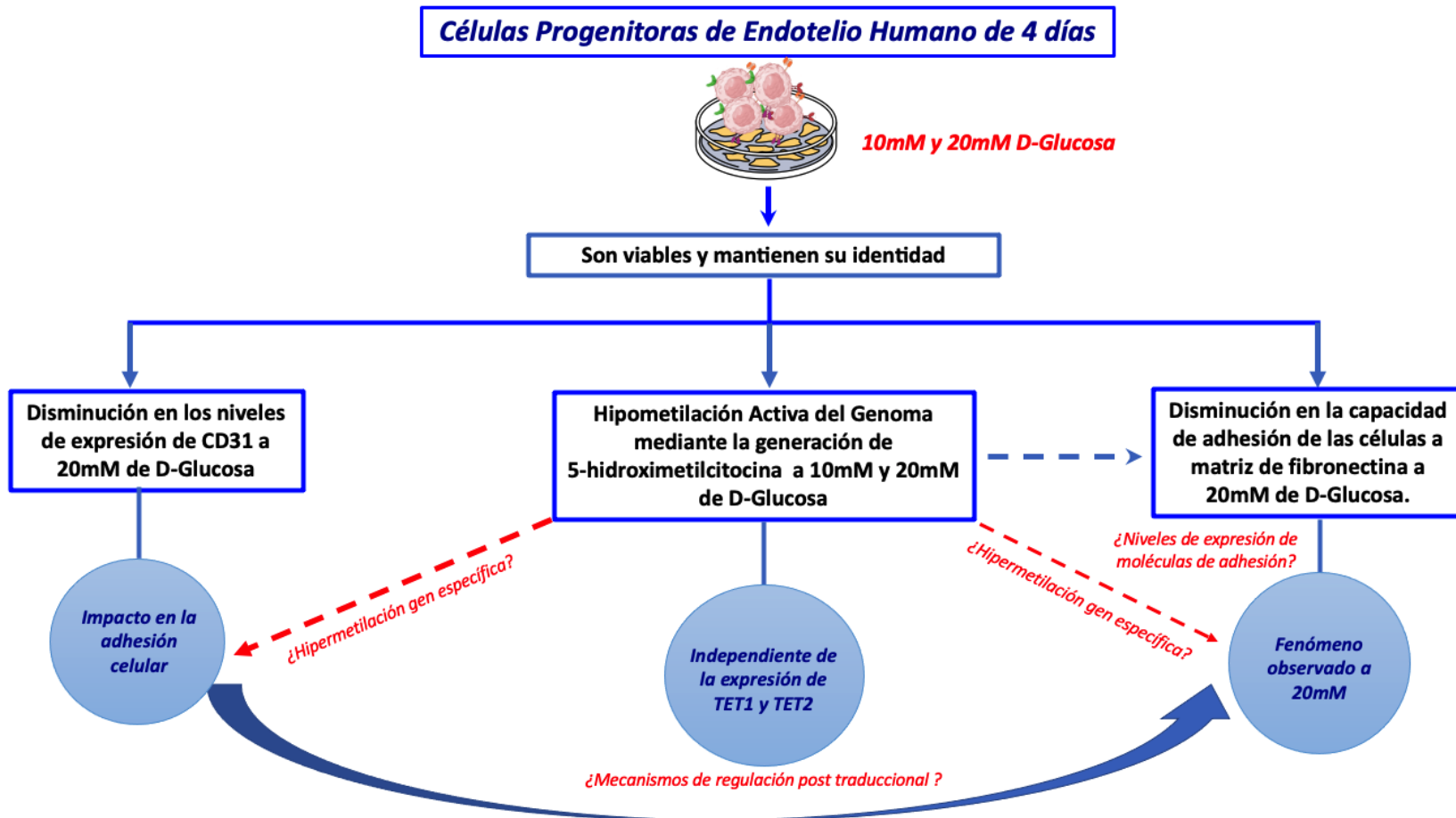


Figura 14: Efecto de las altas concentraciones de D-Glucosa (10mM y 20mM) sobre Células Progenitoras de Endotelio a 4 días de cultivo (hEPC-4d).

Las altas concentraciones de D-Glucosa afectan la maduración celular al disminuir los niveles de expresión del marcador de endotelio CD31, adicionalmente la capacidad de las células se ve disminuida frente a 20mM de D-Glucosa, sin embargo, los cambios en el estado de metilación de las células (hipometilación) se observan desde los 10mM de D-Glucosa.

7. PROYECCIONES:

En la presente investigación se analizó cómo las altas concentraciones de D-Glucosa afectan el estado de metilación global del ADN de las hEPC y su correlación con la falla en el proceso de adhesión de estas células a una matriz. Por lo tanto, a partir de este estudio se desprenden las siguientes proyecciones:

En primer lugar, es importante destacar que bajo la metodología de cultivo primario utilizada es factible obtener Células Progenitoras de Endotelio Humano tempranas, lo cual permite ampliar aún más la caracterización de estas células a través de otros marcadores de superficie como CD133, FW, entre otros, y a la vez evaluar cómo se ven afectados los niveles de expresión de los marcadores de superficie de inmadurez celular y de endotelio en las diferentes condiciones de cultivo. Pues la falla en la adhesión también pudiese estar dada por que las hEPC en presencia de altas concentraciones de D-Glucosa no alcanzan una madurez funcional.

Con relación a los resultados obtenidos, si bien el estudio los niveles de metilación global mediante slot blot, indican que las altas concentraciones de D-Glucosa generan una hipometilación del genoma en las hEPC, esto podría confirmarse mediante otro ensayo de carácter cuantitativo como ELISA o algún kit comercial. Siguiendo en esta misma línea y sabiendo que la hipometilación del genoma es una marca presente en diferentes tipos de cáncer, la cual va acompañada de metilación gen específica (Rhee et al., 2015), el siguiente paso

en esta investigación sería evaluar el estado de metilación de algunos genes fundamentales en los procesos angiogénicos mediados por hEPC. Como ha sido mencionado, el proceso angiogénico implica la acción coordinada de SDF-1, CXCR4, VEGF y KDR e interesantemente, se ha observado que los tres genes expresados en EPC (*CXCR4*, *VEGF* y *KDR*) están sujetos a regulación a través de metilación. En el caso del receptor CXCR4, se ha observado que las islas CpG de la región promotora de células cancerígenas se encuentran hipermetiladas al igual que en líneas celulares de adenocarcinomas pancreáticos primarios (45% y 46% respectivamente) en comparación con células normales que no poseen islas CpG metiladas, resultados que se correlacionan inversamente con los niveles de expresión del receptor (Sato, Matsubayashi, Fukushima, & Goggins, 2005). De manera similar, Ramos et al. observaron en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435, un 91% de hipermetilación en los dinucleótidos CpG cercanos al sitio de inicio de la transcripción, lo cual se correlaciona con los niveles disminuidos de mensajero de dicho receptor. En relación a VEGF y su receptor KDR, ya en el año 2009, Kim et al. evaluaron el estado de metilación de los promotores de los genes *VEGF* y *KDR* en diferentes líneas celulares de cáncer (estómago, colon y hepatocarcinoma celular), observado niveles variables de hipermetilación en los promotores del gen *KDR*, fenómeno que se correlacionó con una disminución en la expresión del mensajero de dicho gen (Kim et al., 2009). Resultados similares fueron obtenidos por Quentmeier et al., quienes estudiaron líneas celulares de leucemia

observando que el promotor del gen *KDR* se encuentra hipermetilado asociado a una disminución en la expresión de la proteína (Quentmeier et al., 2012).

A nivel de células endoteliales actualmente se sabe, que en condiciones normales, *KDR* y otros genes endoteliales (*eNOS*, *FW*, *E-cadherina* entre otros) se encuentran hipometilados en comparación con las células no endoteliales (Fraigneau, Palii, Allan, & Brand, 2015), y entre células endoteliales diferenciadas y EPC tempranas existen diferencias en los patrones de metilación de los promotores de estos genes, predominado en estas últimas un estado de hipermetilación en comparación con las células endoteliales maduras, metilación que disminuye frente a hipoxia, el cual es un estímulo que compromete su diferenciación a un linaje endotelial (Ohtani et al., 2011), siendo probable que las diferencias entre los estados de metilación global y promotor específico en estas células se correlacionen con el proceso de diferenciación y función celular. Por lo tanto, queda como interrogante determinar si junto a la hipometilación global del genoma de las hEPC producidas por las altas concentraciones de D-glucosa, se observa una hipermetilación gen específica, en los genes claves para el proceso angiogénico.

En cuanto a la función angiogénica estudiada, se observó una disminución en la adhesión de estas células a una matriz de fibronectina, quedando como proyección el estudio del perfil de integrinas expresado por las hEPC en altas concentraciones de D-Glucosa, observando en detalle la integrina $\alpha 4\beta 1$ ya que ésta participa en mayor grado en la adhesión de las hEPC, resultando

fundamental conocer sus niveles de expresión del gen a nivel de ARN mensajero y el estado de metilación del gen que la expresa, ya que se ha observado en la línea celular de cáncer de próstata DU145, que la hipermetilación en el gen de la integrina $\alpha 4$, disminuye su expresión (Mostafavi-Pour et al., 2015). Similares resultados han sido observados en la línea celular de cáncer de mama ZR-75, en donde la baja expresión de la integrina $\alpha 4$ se debe a una hipermetilación de su gen (Do et al., 2014), fenómeno que se podría repetir en las hEPC cultivadas en condiciones de alta D-Glucosa. Asociado al punto anterior, si bien la adhesión constituye un paso crucial en el proceso de reparación vascular, sería interesante conocer, si la hipometilación global observada tiene un impacto sobre otras funciones angiogénicas de las hEPC, como, por ejemplo, la incorporación de estas células cultivadas en alta D-glucosa a una red vascular existente, así como también evaluar su capacidad de migración mediante gradientes quimiotácticos.

Respecto a la discrepancia de los resultados obtenidos en los niveles de expresión de las enzimas TET con la literatura, resulta fundamental robustecer aún más el tamaño muestral de los análisis por qPCR para estas enzimas incorporando el análisis de la enzima TET3, y así evaluar si esta diferencia de resultados es producto del bajo número de muestras trabajadas en este estudio o se debe a que específicamente en hEPC la oxidación de 5mC a 5hmC es un fenómeno independiente a nivel de expresión de TET. Adicionalmente, es necesario estudiar el rol de la enzima hOGG1 en la demetilación de 5mC, pues se ha observado que cuando Células Epiteliales de Glándula Mamaria (MCF10A)

deficientes del gen OGG1 (OGG1^{-/-}) son tratadas con H₂O₂, no se observa una reducción en los niveles de 5mC y tampoco un aumento significativo en los niveles de 5hmC respecto a las células *wild type* (p<0,05), lo que plantea que OGG1 tendría un rol clave en la demetilación del genoma. Además se ha observado mediante co-inmunoprecipitación, una interacción entre las proteínas OGG1 y TET1 en (p<0,05), por lo que OGG1 reclutaría a TET1 hacia la base 8-OHdG, facilitando la conversión de 5mC a 5hmC cerca de los sitios de daño inducido por ROS, para posteriormente promover la incorporación de una citosina demetilada por la maquinaria de reparación BER (Zhou et al., 2016).

Finalmente, los resultados obtenidos plantean nuevas interrogantes, como por ejemplo, conocer si la disminución en la expresión de CD31 está asociada a una hipermetilación gen específica de la región promotora del gen que codifica esta proteína, marca epigenética que podría estar presente también en el gen de la integrina $\alpha 4\beta 1$, ya que como se mencionó anteriormente, es la principal integrina que participa en la adhesión de las hEPC. Adicionalmente, queda por investigar, los mecanismos de regulación postraduccional que están relacionados al aumento de la actividad de las enzimas TET, puesto que los resultados son contundentes al evidenciar, mediante el aumento de 5hmC en altas concentraciones de D-Glucosa, que las hEPC en estas condiciones de cultivo, presentan actividad de estas enzimas.

Desde una perspectiva clínica, los resultados obtenidos en el presente estudio destacan la importancia de la mantención en el paciente diabético tipo 2, de una glicemia lo más cercana a la normalidad, ya que, si bien la disminución en la expresión de CD31 y la disminución en capacidad de adhesión de las hEPC se presentó con diferencias estadísticamente significativas en la concentración de 20mM de D-Glucosa, los cambios a nivel molecular en el genoma de las hEPC, específicamente la hipometilación observada, se presenta a concentraciones más bajas (10mM). En consecuencia, en el contexto de DM2, los controles glicémicos deficientes conducen a una hiperglicemia sostenida en el tiempo, la cual puede inducir silenciosamente la hipometilación del genoma de hEPC, lo que afecta la función de adhesión de estas células y, por lo tanto, perjudica la reparación vascular en pacientes con DM2.

El desafío de futuras investigaciones en esta área se focaliza en analizar si estos cambios observados *in vitro* son reproducibles en hEPC provenientes de pacientes con DM2; resultando fundamental evaluar cambios en los niveles de metilación del ADN, ya que en la actualidad la 5hmC se ha posicionado como la sexta base del ADN, la cual introduce un código epigenético adicional en el genoma (Ciccarone, Valentini, Zampieri, & Caiafa, 2015). Por lo tanto, en el contexto de DM2, la presencia de 5hmC puede considerarse un nuevo biomarcador en pacientes que debutan con la patología o que presentan glicemia alterada en ayunas, con el objetivo de realizar un monitoreo temprano del estado de metilación del ADN en las hEPC, pues como se ha observado en este estudio

los cambios en el estado de metilación del ADN aparecen antes de que se pueda detectar cualquier alteración en la función celular, reafirmando nuevamente la importancia de mantener una glicemia lo más cercana posible a los valores normales.

Finalmente, de acuerdo a los datos analizados en esta investigación, la disfunción en la maduración y en la actividad de adhesión celular de las hEPC radica en cambios tempranos a nivel molecular, por lo tanto, conocer el estado de metilación de estas células, las cuales son fundamentales para el proceso angiogénico, aportaría información relevante para ajustar de manera oportuna los objetivos terapéuticos individuales de cada paciente y así realizar una medicina personalizada con características preventivas y no terapéuticas a fin de evitar el desarrollo en el tiempo, de complicaciones micro y macrovasculares características de los pacientes con DM2.

7. BIBLIOGRAFIA

1. AbuArrah, M., Yuli Setianto, B., Faisal, A., & Hamim Sadewa, A. (2021). 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine as Oxidative DNA Damage Biomarker of Medical Ionizing Radiation: A Scoping Review. *J Biomed Phys Eng*, 11(3), 389-402. doi:10.31661/jbpe.v0i0.2101-1258
2. Ahmed, S. A. H., Ansari, S. A., Mensah-Brown, E. P. K., & Emerald, B. S. (2020). The role of DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Clin Epigenetics*, 12(1), 104. doi:10.1186/s13148-020-00896-4
3. Aiuti, A., Tavian, M., Cipponi, A., Ficara, F., Zappone, E., Hoxie, J., . . . Bordignon, C. (1999). Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur J Immunol*, 29(6), 1823-1831. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1823::AID-IMMU1823>3.0.CO;2-B
4. Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15(7), 539-553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
5. Aoki, M., Yasutake, M., & Murohara, T. (2004). Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells*, 22(6), 994-1002. doi:10.1634/stemcells.22-6-994
6. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., . . . Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964-967.
7. Auboeuf, D. (2020). Physicochemical Foundations of Life that Direct Evolution: Chance and Natural Selection are not Evolutionary Driving Forces. *Life (Basel)*, 10(2). doi:10.3390/life10020007
8. Bai, P., Nagy, L., Fodor, T., Liaudet, L., & Pacher, P. (2015). Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. *Trends Endocrinol Metab*, 26(2), 75-83. doi:10.1016/j.tem.2014.11.003
9. Baiula, M., Spampinato, S., Gentilucci, L., & Tolomelli, A. (2019). Novel Ligands Targeting α . *Front Chem*, 7, 489. doi:10.3389/fchem.2019.00489
10. Balaji, S., King, A., Crombleholme, T. M., & Keswani, S. G. (2013). The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(6), 283-295. doi:10.1089/wound.2012.0398
11. Balestrieri, M. L., Servillo, L., Esposito, A., D'Onofrio, N., Giovane, A., Casale, R., . . . Marfella, R. (2013). Poor glycaemic control in type 2 diabetes patients reduces endothelial progenitor cell number by influencing SIRT1 signalling via platelet-activating factor receptor activation. *Diabetologia*, 56(1), 162-172. doi:10.1007/s00125-012-2749-0
12. Basile, D. P., & Yoder, M. C. (2014). Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol*, 229(1), 10-16. doi:10.1002/jcp.24423

13. Bauer, C., Göbel, K., Nagaraj, N., Colantuoni, C., Wang, M., Müller, U., . . . Leonhardt, H. (2015). Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem*, *290*(8), 4801-4812. doi:10.1074/jbc.M114.605881
14. Bhutani, N., Burns, D. M., & Blau, H. M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell*, *146*(6), 866-872. doi:10.1016/j.cell.2011.08.042
15. Birch, H. L. (2018). Extracellular Matrix and Ageing. *Subcell Biochem*, *90*, 169-190. doi:10.1007/978-981-13-2835-0_7
16. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, *414*(6865), 813-820. doi:10.1038/414813a
17. Caiado, F., & Dias, S. (2012). Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair*, *5*, 4. doi:10.1186/1755-1536-5-4
18. Cencioni, C., Spallotta, F., Greco, S., Martelli, F., Zeiher, A. M., & Gaetano, C. (2014). Epigenetic mechanisms of hyperglycemic memory. *Int J Biochem Cell Biol*, *51*, 155-158. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.014
19. Chen, Y. H., Lin, S. J., Lin, F. Y., Wu, T. C., Tsao, C. R., Huang, P. H., . . . Chen, J. W. (2007). High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes*, *56*(6), 1559-1568. doi:10.2337/db06-1103
20. Chong, M. S., Ng, W. K., & Chan, J. K. (2016). Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. *Stem Cells Transl Med*, *5*(4), 530-538. doi:10.5966/sctm.2015-0227
21. Chopra, H., Hung, M. K., Kwong, D. L., Zhang, C. F., & Pow, E. H. N. (2018). Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and Prospects. *Stem Cells Int*, *2018*, 9847015. doi:10.1155/2018/9847015
22. Churdchomjan, W., Kheolamai, P., Manochantr, S., Tapanadechopone, P., Tantrawatpan, C., U-Pratya, Y., & Issaragrisil, S. (2010). Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocr Disord*, *10*, 5. doi:10.1186/1472-6823-10-5
23. Ciccarone, F., Klinger, F. G., Catizone, A., Calabrese, R., Zampieri, M., Bacalini, M. G., . . . Caiafa, P. (2012). Poly(ADP-ribosyl)ation acts in the DNA demethylation of mouse primordial germ cells also with DNA damage-independent roles. *PLoS One*, *7*(10), e46927. doi:10.1371/journal.pone.0046927
24. Ciccarone, F., Valentini, E., Bacalini, M. G., Zampieri, M., Calabrese, R., Guastafierro, T., . . . Caiafa, P. (2014). Poly(ADP-ribosyl)ation is involved in the epigenetic control of TET1 gene transcription. *Oncotarget*, *5*(21), 10356-10367.
25. Ciccarone, F., Valentini, E., Zampieri, M., & Caiafa, P. (2015). 5mC-hydroxylase activity is influenced by the PARylation of TET1 enzyme. *Oncotarget*, *6*(27), 24333-24347. doi:10.18632/oncotarget.4476
26. Claudio Gutiérrez Vásquez, F. P. A., Francisca Rinaldi Langlotz, Victoria Novik Assael. (2021). *Diabetes mellitus tipo 2 de inicio en paciente joven: Implicancias en la población chilena*. Retrieved from
27. Costes, S., Bertrand, G., & Ravier, M. A. (2021). Mechanisms of Beta-Cell Apoptosis in Type 2 Diabetes-Prone Situations and Potential Protection by GLP-1-Based Therapies. *Int J Mol Sci*, *22*(10). doi:10.3390/ijms22105303
28. D'Apolito, M., Colia, A. L., Lasalvia, M., Capozzi, V., Falcone, M. P., Pettoello-Mantovani, M., . . . Giardino, I. (2017). Urea-induced ROS accelerate senescence

- in endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*, 263, 127-136. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.028
29. Dariya, B., & Nagaraju, G. P. (2020). Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. *Drug Discov Today*, 25(9), 1614-1623. doi:10.1016/j.drudis.2020.07.003
 30. Davison, G. W., Irwin, R. E., & Walsh, C. P. (2021). The metabolic-epigenetic nexus in type 2 diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*, 170, 194-206. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.025
 31. Dayeh, T., Volkov, P., Salö, S., Hall, E., Nilsson, E., Olsson, A. H., . . . Ling, C. (2014). Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet*, 10(3), e1004160. doi:10.1371/journal.pgen.1004160
 32. De Falco, E., Porcelli, D., Torella, A. R., Straino, S., Iachininoto, M. G., Orlandi, A., . . . Pesce, M. (2004). SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*, 104(12), 3472-3482. doi:10.1182/blood-2003-12-4423
 33. Deb, A., Skelding, K. A., Wang, S., Reeder, M., Simper, D., & Caplice, N. M. (2004). Integrin profile and in vivo homing of human smooth muscle progenitor cells. *Circulation*, 110(17), 2673-2677. doi:10.1161/01.CIR.0000139842.15651.B2
 34. Dhliwayo, N., Sarras, M. P., Luczkowski, E., Mason, S. M., & Intine, R. V. (2014). Parp inhibition prevents ten-eleven translocase enzyme activation and hyperglycemia-induced DNA demethylation. *Diabetes*, 63(9), 3069-3076. doi:10.2337/db13-1916
 35. Do, S. I., Ko, E., Kang, S. Y., Lee, J. E., Nam, S. J., Cho, E. Y., & Kim, D. H. (2014). Aberrant DNA methylation of integrin $\alpha 4$ in human breast cancer. *Tumour Biol*, 35(7), 7079-7084. doi:10.1007/s13277-014-1952-7
 36. Egan, C. G., Fondelli, C., Pierantozzi, E., Tripepi, G., Dotta, F., & Sorrentino, V. (2018). Putative endothelial progenitor cells predict long-term mortality in type-2 diabetes. *Endocrine*, 62(1), 263-266. doi:10.1007/s12020-018-1695-0
 37. Egan, C. G., Lavery, R., Caporali, F., Fondelli, C., Laghi-Pasini, F., Dotta, F., & Sorrentino, V. (2008). Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51(7), 1296-1305. doi:10.1007/s00125-008-0939-6.
 38. Filippi, A., Constantin, A., Alexandru, N., Voicu, G., Constantinescu, C. A., Rebleanu, D., . . . Georgescu, A. (2020). Integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ are Reduced in Endothelial Progenitor Cells from Diabetic Dyslipidemic Mice and May Represent New Targets for Therapy in Aortic Valve Disease. *Cell Transplant*, 29, 963689720946277. doi:10.1177/0963689720946277
 39. Forslund, J. M., & Archdeacon, M. T. (2015). The Pathobiology of Diabetes Mellitus in Bone Metabolism, Fracture Healing, and Complications. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 44(10), 453-457.
 40. Fraigneau, S., Palii, C. G., Allan, D. S., & Brand, M. (2015). Epigenetic regulation of endothelial-cell-mediated vascular repair. *FEBS J*, 282(9), 1605-1629. doi:10.1111/febs.13183

41. Fu, D., Zhao, H., He, L., & Feng, H. (2020). DM-induced Hypermethylation of IR and IGF1R attenuates mast cell activation and airway responsiveness in rats. *J Cell Mol Med*, 24(24), 14381-14391. doi:10.1111/jcmm.16059
42. Fujisawa, T., Tura-Ceide, O., Hunter, A., Mitchell, A., Vesey, A., Medine, C., . . . Brittan, M. (2019). Endothelial Progenitor Cells Do Not Originate From the Bone Marrow. *Circulation*, 140(18), 1524-1526. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042351
43. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., . . . Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 21(17). doi:10.3390/ijms21176275
44. Garcia Soriano F, Virág, L., Jagtap, P., Szabó, E., Mabley, J. G., Liaudet, L., . . . Szabó, C. (2001). Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med*, 7(1), 108-113. doi:10.1038/83241
45. Godo, S., & Shimokawa, H. (2017). Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37(9), e108-e114. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309813
46. Goldberg, R. B. (2009). Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(9), 3171-3182. doi:10.1210/jc.2008-2534
47. Goligorsky, M. S. (2014). Endothelial progenitor cells: from senescence to rejuvenation. *Semin Nephrol*, 34(4), 365-373. doi:10.1016/j.semnephrol.2014.06.003
48. Gong, Y. Y., Liu, Y. Y., Li, J., Su, L., Yu, S., Zhu, X. N., . . . Xiao, H. P. (2014). Hypermethylation of Cox5a promoter is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of high fat diet-induced insulin resistant rats. *PLoS One*, 9(12), e113784. doi:10.1371/journal.pone.0113784
49. Goulev, Y., Morlot, S., Matifas, A., Huang, B., Molin, M., Toledano, M. B., & Charvin, G. (2017). Nonlinear feedback drives homeostatic plasticity in H. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.23971
50. Guillaumet-Adkins, A., Yañez, Y., Peris-Diaz, M. D., Calabria, I., Palanca-Ballester, C., & Sandoval, J. (2017). Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 9175806. doi:10.1155/2017/9175806
51. Halim, M., & Halim, A. (2019). The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes Metab Syndr*, 13(2), 1165-1172. doi:10.1016/j.dsx.2019.01.040
52. Hamed, S., Brenner, B., Aharon, A., Daoud, D., & Roguin, A. (2009). Nitric oxide and superoxide dismutase modulate endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 8, 56. doi:10.1186/1475-2840-8-56
53. He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., . . . Xu, G. L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303-1307. doi:10.1126/science.1210944
54. Hegedús, C., & Virág, L. (2014). Inputs and outputs of poly(ADP-ribosylation): Relevance to oxidative stress. *Redox Biol*, 2C, 978-982. doi:10.1016/j.redox.2014.08.003
55. Henning, R. J. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol*, 14(6), 491-509. doi:10.2217/fca-2018-0045
56. Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., & Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular

- function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 348(7), 593-600. doi:10.1056/NEJMoa022287
57. Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R., & Neil, H. A. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 359(15), 1577-1589. doi:10.1056/NEJMoa0806470
 58. Hosaka, T., Biggs, W. H., Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K., & Arden, K. C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 2975-2980. doi:10.1073/pnas.0400093101
 59. Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*, 345(11), 790-797. doi:10.1056/NEJMoa010492
 60. Huang, R. X., & Zhou, P. K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 60. doi:10.1038/s41392-020-0150-x
 61. Hur, J., Yoon, C. H., Kim, H. S., Choi, J. H., Kang, H. J., Hwang, K. K., . . . Park, Y. B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(2), 288-293. doi:10.1161/01.ATV.0000114236.77009.06
 62. Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., & Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*, 100, 1-19. doi:10.1016/j.vph.2017.05.005
 63. International Diabetes Federation, I. (2021). DIABETES ATLAS. In D. V. D. D. Design (Ed.), *IDF DIABETES ATLAS* (Tenth ed., pp. 1-141).
 64. Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., . . . Suda, T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 12(4), 446-451. doi:10.1038/nm1388
 65. Jin, H., Aiyer, A., Su, J., Borgstrom, P., Stupack, D., Friedlander, M., & Varner, J. (2006). A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest*, 116(3), 652-662. doi:10.1172/JCI24751
 66. Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7), 484-492. doi:10.1038/nrg3230
 67. JP, L., J, H., Y, T., B, W., IG, W., & PJ, S. (2013). Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. In.
 68. Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci*, 22(9). doi:10.3390/ijms22094642
 69. Jujo, K., li, M., & Losordo, D. W. (2008). Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 45(4), 530-544. doi:10.1016/j.jmcc.2008.08.003
 70. Kang, H., Ma, X., Liu, J., Fan, Y., & Deng, X. (2017). High glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction. *Diab Vasc Dis Res*, 14(5), 381-394. doi:10.1177/1479164117719058

71. Keighron, C., Lyons, C. J., Creane, M., O'Brien, T., & Liew, A. (2018). Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med (Lausanne)*, 5, 354. doi:10.3389/fmed.2018.00354
72. Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., & Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*, 109(7), 2679-2687. doi:10.1182/blood-2006-09-047704
73. Kim, J. Y., Hwang, J. H., Zhou, W., Shin, J., Noh, S. M., Song, I. S., . . . Kim, J. (2009). The expression of VEGF receptor genes is concurrently influenced by epigenetic gene silencing of the genes and VEGF activation. *Epigenetics*, 4(5), 313-321.
74. Ko, M., An, J., Bandukwala, H. S., Chavez, L., Aijö, T., Pastor, W. A., . . . Rao, A. (2013). Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 497(7447), 122-126. doi:10.1038/nature12052
75. Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006502. doi:10.1101/cshperspect.a006502
76. Lamalice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 100(6), 782-794. doi:10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e
77. Li, B., Sharpe, E. E., Maupin, A. B., Teleron, A. A., Pyle, A. L., Carmeliet, P., & Young, P. P. (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*, 20(9), 1495-1497. doi:10.1096/fj.05-5137fje
78. Lima, J. E., Xavier, D.J., & Sakamoto-Hojo, E.T. (2018). *Oxidative Stress, DNA Damage and Repair Pathways in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus* intechOpen.
79. Liu, L., Cui, Y., Li, X., Que, X., Xiao, Y., Yang, C., . . . Liu, Z. (2019). Concomitant overexpression of triple antioxidant enzymes selectively increases circulating endothelial progenitor cells in mice with limb ischaemia. *J Cell Mol Med*, 23(6), 4019-4029. doi:10.1111/jcmm.14287
80. Lu, D., Maulik, N., Moraru, I. I., Kreutzer, D. L., & Das, D. K. (1993). Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol*, 264(3 Pt 1), C715-722. doi:10.1152/ajpcell.1993.264.3.C715
81. Ma, Q., Li, Y., Li, P., Wang, M., Wang, J., Tang, Z., . . . Zhao, B. (2019). Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora. *Biomed Pharmacother*, 117, 109138. doi:10.1016/j.biopha.2019.109138
82. Marchetti, V., Menghini, R., Rizza, S., Vivanti, A., Feccia, T., Lauro, D., . . . Federici, M. (2006). Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling. *Diabetes*, 55(8), 2231-2237. doi:10.2337/db06-0369
83. Marçola, M., & Rodrigues, C. E. (2015). Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. *Stem Cells Int*, 2015, 832649. doi:10.1155/2015/832649
84. Massberg, S., Konrad, I., Schürzinger, K., Lorenz, M., Schneider, S., Zohlnhoefer, D., . . . Gawaz, M. (2006). Platelets secrete stromal cell-derived

- factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*, 203(5), 1221-1233. doi:10.1084/jem.20051772
85. Meigs, J. B. (2019). The Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes: Opportunities for Health Translation. *Curr Diab Rep*, 19(8), 62. doi:10.1007/s11892-019-1173-y
 86. Mena, H. A., Zubiry, P. R., Dizier, B., Schattner, M., Boisson-Vidal, C., & Negrotto, S. (2018). Acidic preconditioning of endothelial colony-forming cells (ECFC) promote vasculogenesis under proinflammatory and high glucose conditions in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 120. doi:10.1186/s13287-018-0872-7
 87. Mezu-Ndubuisi, O. J., & Maheshwari, A. (2021). The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr Res*, 89(7), 1619-1626. doi:10.1038/s41390-020-01177-9
 88. Michaud, S. E., Dussault, S., Haddad, P., Groleau, J., & Rivard, A. (2006). Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*, 187(2), 423-432. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.009
 89. Montorfano, I., Becerra, A., Cerro, R., Echeverría, C., Sáez, E., Morales, M. G., . . . Simon, F. (2014). Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway. *Lab Invest*, 94(10), 1068-1082. doi:10.1038/labinvest.2014.100
 90. Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. doi:10.1038/npp.2012.112
 91. Morrone, D., Picoi, M. E. L., Felice, F., De Martino, A., Scatena, C., Spontoni, P., . . . Balbarini, A. (2021). Endothelial Progenitor Cells: An Appraisal of Relevant Data from Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*, 22(23). doi:10.3390/ijms222312874
 92. Mostafavi-Pour, Z., Kianpour, S., Dehghani, M., Mokarram, P., Torabinejad, S., & Monabati, A. (2015). Methylation of Integrin α 4 and E-Cadherin Genes in Human Prostate Cancer. *Pathol Oncol Res*, 21(4), 921-927. doi:10.1007/s12253-015-9917-8
 93. Mukai, N., Akahori, T., Komaki, M., Li, Q., Kanayasu-Toyoda, T., Ishii-Watabe, A., . . . Morita, I. (2008). A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res*, 314(3), 430-440. doi:10.1016/j.yexcr.2007.11.016
 94. Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., . . . Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382(6592), 635-638. doi:10.1038/382635a0
 95. Nilsson, E., Matte, A., Perfilyev, A., de Mello, V. D., Käkelä, P., Pihlajamäki, J., & Ling, C. (2015). Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(11), E1491-1501. doi:10.1210/jc.2015-3204
 96. Ohtani, K., Vlachojannis, G. J., Koyanagi, M., Boeckel, J. N., Urbich, C., Farcas, R., . . . Dimmeler, S. (2011). Epigenetic regulation of endothelial lineage committed genes in pro-angiogenic hematopoietic and endothelial progenitor cells. *Circ Res*, 109(11), 1219-1229. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247304
 97. Omari Shekaftik, S., & Nasirzadeh, N. (2021). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative DNA damage induced by occupational

- exposure to nanomaterials: a systematic review. *Nanotoxicology*, 15(6), 850-864. doi:10.1080/17435390.2021.1936254
98. Ouni, M., Saussenthaler, S., Eichelmann, F., Jähnert, M., Stadion, M., Wittenbecher, C., . . . Schürmann, A. (2020). Epigenetic Changes in Islets of Langerhans Preceding the Onset of Diabetes. *Diabetes*, 69(11), 2503-2517. doi:10.2337/db20-0204
 99. Parveen, N., & Dhawan, S. (2021). DNA Methylation Patterning and the Regulation of Beta Cell Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 651258. doi:10.3389/fendo.2021.651258
 100. Patel, A., MacMahon, S., Chalmers, J., Neal, B., Billot, L., Woodward, M., . . . Group, A. C. (2008). Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 358(24), 2560-2572. doi:10.1056/NEJMoa0802987
 101. Pearson, J. D. (2009). Endothelial progenitor cells - hype or hope? *J Thromb Haemost*, 7(2), 255-262. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03214.x
 102. Pinzón-Cortés, J. A., Perna-Chaux, A., Rojas-Villamizar, N. S., Díaz-Basabe, A., Polanía-Villanueva, D. C., Jácome, M. F., . . . López-Segura, V. (2017). Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. *Endocr Connect*, 6(8), 708-725. doi:10.1530/EC-17-0199
 103. Pirola, L., Balcerczyk, A., Tothill, R. W., Haviv, I., Kaspi, A., Lunke, S., . . . El-Osta, A. (2011). Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res*, 21(10), 1601-1615. doi:10.1101/gr.116095.110
 104. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97, 55-74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
 105. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., . . . Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 8416763. doi:10.1155/2017/8416763
 106. Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J*, 18, 207-219. doi:10.1016/j.csbj.2019.12.013
 107. Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*, 387, 95-105. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.042
 108. Pyšná, A., Bém, R., Němcová, A., Fejfarová, V., Jirkovská, A., Hazdrová, J., . . . Dubský, M. (2019). Endothelial Progenitor Cells Biology in Diabetes Mellitus and Peripheral Arterial Disease and their Therapeutic Potential. *Stem Cell Rev Rep*, 15(2), 157-165. doi:10.1007/s12015-018-9863-4
 109. Quentmeier, H., Eberth, S., Romani, J., Weich, H. A., Zaborski, M., & Drexler, H. G. (2012). DNA methylation regulates expression of VEGF-R2 (KDR) and VEGF-R3 (FLT4). *BMC Cancer*, 12, 19. doi:10.1186/1471-2407-12-19
 110. Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W., & Ratajczak, J. (2006). The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, 20(11), 1915-1924. doi:10.1038/sj.leu.2404357

111. Reddy, M. A., Zhang, E., & Natarajan, R. (2015). Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*, *58*(3), 443-455. doi:10.1007/s00125-014-3462-y
112. Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M., & March, K. L. (2003). Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, *107*(8), 1164-1169.
113. Rhee, Y. Y., Lee, T. H., Song, Y. S., Wen, X., Kim, H., Jheon, S., . . . Kang, G. H. (2015). Prognostic significance of promoter CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in stage I lung adenocarcinoma. *Virchows Arch*, *466*(6), 675-683. doi:10.1007/s00428-015-1749-0
114. Roden, M., & Shulman, G. I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*, *576*(7785), 51-60. doi:10.1038/s41586-019-1797-8
115. Rohde, E., Schallmoser, K., Reinisch, A., Hofmann, N. A., Pfeifer, T., Fröhlich, E., . . . Strunk, D. (2011). Pro-angiogenic induction of myeloid cells for therapeutic angiogenesis can induce mitogen-activated protein kinase p38-dependent foam cell formation. *Cytotherapy*, *13*(4), 503-512. doi:10.3109/14653249.2010.536214
116. Sambuceti, G., Morbelli, S., Vanella, L., Kusmic, C., Marini, C., Massollo, M., . . . Frassoni, F. (2009). Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme oxygenase-1, and adiponectin. *Stem Cells*, *27*(2), 399-407. doi:10.1634/stemcells.2008-0800
117. Sato, N., Matsubayashi, H., Fukushima, N., & Goggins, M. (2005). The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*, *4*(1), 70-76. doi:10.4161/cbt.4.1.1378
118. Schellenberg, E. S., Dryden, D. M., Vandermeer, B., Ha, C., & Korownyk, C. (2013). Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, *159*(8), 543-551. doi:10.7326/0003-4819-159-8-201310150-00007
119. Schmidt, A. M. (2018). Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *38*(1), e1-e8. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310221
120. Sharma, M., Afrin, F., Satija, N., Tripathi, R. P., & Gangenahalli, G. U. (2011). Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Stem Cells Dev*, *20*(6), 933-946. doi:10.1089/scd.2010.0263
121. Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., & Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, *28*(3), 495-500. doi:10.1006/geno.1995.1180
122. Shumiya, T., Shibata, R., Shimizu, Y., Ishii, M., Kubota, R., Shintani, S., & Murohara, T. (2010). Evidence for the therapeutic potential of ex vivo expanded human endothelial progenitor cells using autologous serum. *Circ J*, *74*(5), 1006-1013.
123. Sorrentino, S. A., Bahlmann, F. H., Besler, C., Müller, M., Schulz, S., Kirchhoff, N., . . . Landmesser, U. (2007). Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with

- type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation*, 116(2), 163-173. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684381
124. Sun, R., Huang, J., & Sun, B. (2020). Mobilization of endothelial progenitor cells in sepsis. *Inflamm Res*, 69(1), 1-9. doi:10.1007/s00011-019-01299-9
 125. Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Kalka, C., Gagne, P. J., Jacobowitz, G. R., . . . Gurtner, G. C. (2002). Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 106(22), 2781-2786.
 126. Tewari, S., Zhong, Q., Santos, J. M., & Kowluru, R. A. (2012). Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(8), 4881-4888. doi:10.1167/iovs.12-9732
 127. Tiedemann, R. L., Eden, H. E., Huang, Z., Robertson, K. D., & Rothbart, S. B. (2021). Distinguishing Active Versus Passive DNA Demethylation Using Illumina MethylationEPIC BeadChip Microarrays. *Methods Mol Biol*, 2272, 97-140. doi:10.1007/978-1-0716-1294-1_7
 128. Tilling, L., Chowienczyk, P., & Clapp, B. (2009). Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*, 68(4), 484-492. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03486.x
 129. Timmermans, F., Plum, J., Yöder, M. C., Ingram, D. A., Vandekerckhove, B., & Case, J. (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*, 13(1), 87-102. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x
 130. Tseng, S. Y., Chao, T. H., Li, Y. H., Liu, P. Y., Lee, C. H., Cho, C. L., . . . Chen, J. H. (2016). Cilostazol improves high glucose-induced impaired angiogenesis in human endothelial progenitor cells and vascular endothelial cells as well as enhances vasculoangiogenesis in hyperglycemic mice mediated by the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway. *J Vasc Surg*, 63(4), 1051-1062.e1053. doi:10.1016/j.jvs.2014.10.103
 131. Tura, O., Skinner, E. M., Barclay, G. R., Samuel, K., Gallagher, R. C., Brittan, M., . . . Mills, N. L. (2013). Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem Cells*, 31(2), 338-348. doi:10.1002/stem.1280
 132. Ungvari, Z., Tarantini, S., Kiss, T., Wren, J. D., Giles, C. B., Griffin, C. T., . . . Csiszar, A. (2018). Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*, 15(9), 555-565. doi:10.1038/s41569-018-0030-z
 133. Unnikrishnan, A., Freeman, W. M., Jackson, J., Wren, J. D., Porter, H., & Richardson, A. (2019). The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther*, 195, 172-185. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.11.001
 134. Urbaniak, S. K., Boguszewska, K., Szewczuk, M., Kaźmierczak-Barańska, J., & Karwowski, B. T. (2020). 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. *Molecules*, 25(1). doi:10.3390/molecules25010202
 135. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., . . . Dimmeler, S. (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial

- progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89(1), E1-7.
136. Vieceli Dalla Sega, F., Aquila, G., Fortini, F., Vaccarezza, M., Secchiero, P., Rizzo, P., & Campo, G. (2017). Context-dependent function of ROS in the vascular endothelium: The role of the Notch pathway and shear stress. *Biofactors*, 43(4), 475-485. doi:10.1002/biof.1359
 137. Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D. A., Ndlovu, M. N., Defrance, M., Deplus, R., . . . Fuks, F. (2012). DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J*, 31(6), 1405-1426. doi:10.1038/emboj.2011.503
 138. Wary, K. K., Vogel, S. M., Garrean, S., Zhao, Y. D., & Malik, A. B. (2009). Requirement of alpha(4)beta(1) and alpha(5)beta(1) integrin expression in bone-marrow-derived progenitor cells in preventing endotoxin-induced lung vascular injury and edema in mice. *Stem Cells*, 27(12), 3112-3120. doi:10.1002/stem.241
 139. Weitzman, S. A., Turk, P. W., Milkowski, D. H., & Kozlowski, K. (1994). Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(4), 1261-1264. doi:10.1073/pnas.91.4.1261
 140. Wu, D., Hu, D., Chen, H., Shi, G., Fetahu, I. S., Wu, F., . . . Shi, Y. G. (2018). Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature*, 559(7715), 637-641. doi:10.1038/s41586-018-0350-5
 141. Wu, Q., & Ni, X. (2015). ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr Drug Targets*, 16(1), 13-19. doi:10.2174/1389450116666150113121054
 142. Wu, X., Li, G., & Xie, R. (2018). Decoding the role of TET family dioxygenases in lineage specification. *Epigenetics Chromatin*, 11(1), 58. doi:10.1186/s13072-018-0228-7
 143. Wu, Y., Cui, W., Zhang, D., Wu, W., & Yang, Z. (2017). The shortening of leukocyte telomere length relates to DNA hypermethylation of LINE-1 in type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget*, 8(43), 73964-73973. doi:10.18632/oncotarget.18167
 144. Xie, K., Wei, D., Shi, Q., & Huang, S. (2004). Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(5), 297-324. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.04.003
 145. Xing, Z., Zhao, C., Liu, H., & Fan, Y. (2020). Endothelial Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Candidate for Regenerative Medicine and Disease Treatment. *Adv Healthc Mater*, e2000255. doi:10.1002/adhm.202000255
 146. Ye, X., Jiang, R., Zhang, Q., Wang, R., Yang, C., Ma, J., & Du, H. (2016). Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA from patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *J Int Med Res*, 44(3), 472-482. doi:10.1177/0300060515621530
 147. Yiu, K. H., & Tse, H. F. (2014). Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial progenitor cell characteristics and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(6), 1136-1143. doi:10.1161/ATVBAHA.114.302192
 148. Yuan, E. F., Yang, Y., Cheng, L., Deng, X., Chen, S. M., Zhou, X., & Liu, S. M. (2019). Hyperglycemia affects global 5-methylcytosine and 5-

- hydroxymethylcytosine in blood genomic DNA through upregulation of SIRT6 and TETs. *Clin Epigenetics*, 11(1), 63. doi:10.1186/s13148-019-0660-y
149. Yue, W. S., Lau, K. K., Siu, C. W., Wang, M., Yan, G. H., Yiu, K. H., & Tse, H. F. (2011). Impact of glycemic control on circulating endothelial progenitor cells and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 10, 113. doi:10.1186/1475-2840-10-113
150. Zampieri, M., Bacalini, M. G., Barchetta, I., Scalea, S., Cimini, F. A., Bertocchini, L., . . . Reale, A. (2021). Increased PARylation impacts the DNA methylation process in type 2 diabetes mellitus. *Clin Epigenetics*, 13(1), 114. doi:10.1186/s13148-021-01099-1
151. Zhang, Y., Su, N., Luo, F., Wen, X., Tang, Y., Yang, J., . . . Chen, L. (2014). Deletion of Fgfr1 in osteoblasts enhances mobilization of EPCs into peripheral blood in a mouse endotoxemia model. *Int J Biol Sci*, 10(9), 1064-1071. doi:10.7150/ijbs.8415
152. Zhang, Y. W., Wang, Z., Xie, W., Cai, Y., Xia, L., Easwaran, H., . . . Baylin, S. B. (2017). Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress. *Mol Cell*, 65(2), 323-335. doi:10.1016/j.molcel.2016.12.013
153. Zhou, X., Zhuang, Z., Wang, W., He, L., Wu, H., Cao, Y., . . . Guo, Z. (2016). OGG1 is essential in oxidative stress induced DNA demethylation. *Cell Signal*, 28(9), 1163-1171. doi:10.1016/j.cellsig.2016.05.021
154. Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., & Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393(6685), 595-599. doi:10.1038/31269