



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas

LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE L-ARGININA VÍA HCAT-1
POR INSULINA INVOLUCRA ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LOS
SUBTIPOS A Y B DE RECEPTORES DE INSULINA Y RECEPTORES DE
ADENOSINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL
HUMANA DE DIABETES GESTACIONAL.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Ciencias
Fisiológicas

Por

ENRIQUE ALBERTO GUZMÁN GUTIÉRREZ

Director de Tesis : Luis Sobrevia
Co-Director de Tesis : Carmen Vázquez

Comisión de Tesis : Juan Carlos Vera
Xavier Figueroa
Gareth Owen
Francisca Bronfman

Enero de 2014

*Para mis Padres, por su incondicional apoyo;
Alejandra, por su sabiduría, amor y compañía;
e Hijo por cambiarme la vida.*

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular (CMPL), de manera particular a mi tutor: Profesor Luis Sobrevia, quien con su gran apoyo y constancia me ayudó crecer como investigador, profesional y como persona. Además, a quienes están y estuvieron en el laboratorio, Carlos Puebla, Carlos Salomón, Francisco Westermeier, Tamara Saez, Rocío Salsoso, Andrea Leiva, Fabian Pardo, Romy Orellana, Amparo Pacheco y Ninoska Muñoz; quienes me ayudaron en el día a día de la vida de un estudiante de doctorado. Además, quiero agradecer al Departamento de Fisiología y Zoología de la Universidad de Sevilla, de manera especial, a la Profesora Carmen Vázquez, quien junto a su equipo de trabajo, Alfonso Mate, Sonia Zambrano, María Victoria “*Marivi*” Ruiz, y Antonio Blanca; me ayudaron durante mis estancias en la Universidad de Sevilla y compartí hermosos momentos que no olvidaré.

También quiero agradecer a los miembros de la comisión de tesis, Dra. Francisca Bronfman, Dr. Juan Carlos Vera, Dr. Xavier Figueroa, Dr. Gareth Owen, y también al Dr. Juan Carlos Sáez quienes por su disposición y comentarios he podido terminar esta tesis, la cual ha abierto nuevas líneas de investigación.

Agradecer a las fuentes de financiamiento: beca de doctorado en Chile, beca de pasantía doctoral en el extranjero y beca de apoyo de tesis doctoral AT-24120944 de CONICYT, y a los proyectos del laboratorio: Anillos ACT-73 CONICYT, y FONDECYT 1110977.

Agradezco de manera muy especial a mis padres Raúl y María, quienes me han apoyado desde siempre con su amor y compañía, a mi hermano Raúl Antonio, Elizabeth y Constanza, quienes me acompañaron como familia durante mi estadía en Santiago.

Agradezco a mi grandes “*Amigos de la vida*”, Renato Martinez y Paulina Fernández, quienes siempre me alentaron a seguir y mirar al frente en todos los desafíos.

Y finalmente agradecer a mi *gran amor* Alejandra, quien me ha dado todo, siempre estaré agradecido por estar conmigo en las buenas y en las malas. Además, agradecer a mi pequeño hijo por darme un nuevo aire a mi vida. Los Amo.

Índice General

Índice general	iii	
Índice de figuras	vi	
Índice de tablas	x	
Abreviaturas	xi	
<i>Resumen</i>	xii	
<i>Abstract</i>	xiii	
1	Introducción	1
1.1	Diabetes gestacional	1
1.1.1	Efecto de la diabetes gestacional sobre la función endotelial	2
1.2	Transporte de L-arginina	3
1.2.1	Transportador de aminoácidos catiónicos tipo 1 (hCAT-1)	4
1.2.2	Regulación del transporte de L-arginina vía hCAT-1	4
1.2.3	Regulación de la expresión de <i>SLC7A1</i>	5
1.2.4	Efecto de la diabetes gestacional sobre el transporte de L-arginina en HUVEC	9
1.3	Receptores de adenosina	10
1.3.1	Rol de los receptores de adenosina en la diabetes gestacional	13
1.4	Insulina	16
1.4.1	Rol de la insulina en diabetes gestacional	17
1.4.2	Regulación del transporte de L-arginina vía hCAT-1 por insulina	19
1.4.3	Receptores de insulina	20
1.4.4	Regulación del efecto de insulina por adenosina	24
1.5	Comentario final	28
2	Hipótesis	30
3	Objetivos	31
3.1	Objetivos generales	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	Métodos	32
4.1	Muestras biológicas y cultivo celular	32
4.1.1	Colección de cordones umbilicales	32
4.1.2	Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana	34
4.1.3	Condiciones experimentales	34
4.1.4	Cuantificación de proteínas	35
4.2	Transporte de L-arginina	36
4.3	Expresión de hCAT-1 y receptores de insulina	39
4.3.1	Western blots	39
4.3.2	Extracción de RNA total y transcripción reversa	39
4.3.3	PCR no cuantitativo	40
4.3.4	PCR cuantitativo (real time)	42
4.4	Promotor <i>SLC7A1</i> y <i>knockdown</i> de receptores de insulina	43

4.4.1	Clonamiento de una región del promotor de <i>SLC7A1</i>	43
4.4.2	Transfección transitoria y medición de la actividad luciferasa	44
4.4.3	Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	45
4.4.4	Silenciamiento génico de IR-A e IR-B	47
4.4.5	Generación de los plásmidos pShuttle-siIR-A y B	47
4.4.6	Recombinación homóloga en células HEK293	48
4.4.7	Cosecha de adenovirus	49
4.4.8	Transducción adenoviral de HUVEC	50
4.5	Estimación del tamaño muestral	50
4.6	Análisis de datos	51
5	Resultados	52
5.1	Características clínicas de las embarazadas y los recién nacidos	52
5.2	Efecto de la diabetes gestacional sobre el transporte de L-arginina	54
5.3	Efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina	58
5.4	Efecto de diabetes gestacional e insulina sobre la abundancia de la proteína hCAT-1 en HUVEC	58
5.5	Efecto de diabetes gestacional e insulina sobre los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC	62
5.6	Efecto de diabetes gestacional e insulina sobre la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i>	62
5.7	Efecto de diabetes gestacional sobre la expresión de las isoformas A y B del receptor de insulina en HUVEC	64
5.8	Silenciamiento de IR-A e IR-B en HUVEC	64
5.9	Efecto de insulina sobre la expresión de las isoformas A y B del receptor de insulina en HUVEC	64
5.10	Participación de IR-A e IR-B en la captación de L-arginina en HUVEC	69
5.11	Participación de IR-A e IR-B en el transporte de L-arginina en HUVEC	69
5.12	Participación de IR-A e IR-B en la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC	74
5.13	Participación de IR-A e IR-B en los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC	74
5.14	Participación de IR-A e IR-B sobre la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC	77
5.15	Efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre la captación de L-arginina en HUVEC	81
5.16	Efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC	84
5.17	Participación de IR-A e IR-B sobre el efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre la captación de L-arginina en HUVEC	95
5.18	Participación de IR-A e IR-B en el efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC normales	104
5.19	Participación de IR-A e IR-B en el efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC con diabetes gestacional	126

5.20	Efecto de los receptores de adenosina e insulina sobre la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC	148
5.21	Efecto de IR-A e IR-B sobre la activación e inhibición de receptores de adenosina en la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC	148
5.22	Efecto de IR-A e IR-B sobre la activación e inhibición de receptores de adenosina en los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC	150
5.23	Efecto de IR-A e IR-B sobre la activación e inhibición de receptores de adenosina en la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC	159
5.24	Efecto de diabetes gestacional sobre la unión de Sp1 al promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC	164
5.25	Efecto de IR-A e IR-B en la unión de Sp1 al promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC	164
6	Discusión	168
6.1	Diabetes gestacional	170
6.2	Efecto de diabetes gestacional sobre el transporte de L-arginina	172
6.3	Efecto de diabetes gestacional sobre la expresión de hCAT-1	173
6.4	Efecto de insulina sobre el transporte del L-arginina en diabetes gestacional	174
6.5	Efecto de insulina en la expresión de hCAT-1 en diabetes gestacional	176
6.6	Participación de las isoformas A y B del receptor de insulina en el transporte de L-arginina	179
6.7	Efecto de los receptores de adenosina sobre el efecto de diabetes gestacional	183
6.8	Efecto de los receptores de adenosina sobre el efecto de insulina en diabetes gestacional	184
6.9	Efecto de los receptores de adenosina y de las isoformas del receptor de insulina en diabetes gestacional	186
7	Conclusiones generales	189
8	Proyecciones	190
9	Referencias	191

Índice de Figuras

	<i>Pág</i>
Figura 1	Esquema de la región promotora desde -1606 pb desde el sitio de inicio de la transcripción de <i>SCL7A1</i> 7
Figura 2	Modulación del transporte de L-arginina vía hCAT-1 por insulina y adenosina en HUVEC de embarazos con diabetes gestacional 29
Figura 3	Diabetes gestacional aumenta la captación de L-arginina en HUVEC 55
Figura 4	Diabetes gestacional aumenta el transporte total y saturable de L-arginina en HUVEC 56
Figura 5	Insulina revierte el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional 59
Figura 6	Insulina revierte el aumento del transporte total y saturable de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional 60
Figura 7	Insulina revierte el aumento de la abundancia de proteína y los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional 61
Figura 8	Insulina revierte el aumento de la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC de diabetes gestacional 63
Figura 9	Diabetes gestacional se asocia con aumento en los niveles de mRNA para IR-A 65
Figura 10	Silenciamiento de las isoformas A y B del receptor de insulina mediante siRNA en HUVEC 66
Figura 11	Silenciamiento específico de las isoformas A y B del receptor de insulina mediante siRNA en HUVEC. 67
Figura 12	Insulina revierte el aumento de los niveles de mRNA para IR-A en HUVEC de diabetes gestacional 68
Figura 13	Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional 70
Figura 14	Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional 71
Figura 15	Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional 75
Figura 16	Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional 76
Figura 17	Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> 78
Figura 18	Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A2A para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales. 82
Figura 19	Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A1 para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional 83
Figura 20	El transporte de L-arginina no se altera por activación de receptores de adenosina en HUVEC provenientes de embarazos normales. 88
Figura 21	Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A2A para aumentar el transporte saturable de L-arginina en HUVEC normales 89

Figura 22	Diabetes gestacional aumenta el transporte de L-arginina de una manera dependiente de receptores de adenosina A _{2A}	90
Figura 23	Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional de una manera dependiente de receptores de adenosina A ₁	91
Figura 24	Insulina requiere de IR-A e IR-B, pero no de receptores de adenosina A ₁ para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales	96
Figura 25	Insulina requiere de IR-A e IR-B, y de receptores de adenosina A _{2A} para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales	97
Figura 26	Insulina requiere de IR-A e IR-B, pero no de receptores de adenosina A _{2B} para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales	98
Figura 27	Insulina requiere de IR-A e IR-B, pero no de receptores de adenosina A ₃ para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales	99
Figura 28	Insulina requiere de IR-A y de receptores de adenosina A ₁ para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional	100
Figura 29	Insulina requiere de IR-A y de receptores de adenosina A _{2A} para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional	101
Figura 30	Insulina requiere de IR-A y no de receptores de adenosina A _{2B} para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional	102
Figura 31	Insulina requiere de IR-A y no de receptores de adenosina A ₃ para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional	103
Figura 32	El transporte de L-arginina no se altera en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-A en presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina	105
Figura 33	Insulina no aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-A en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina	107
Figura 34	El transporte de L-arginina no se altera en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-B en presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina.	109
Figura 35	Insulina no aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-B en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina	111
Figura 36	HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-A e IR-B en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina no cambian el transporte de L-arginina	113
Figura 37	Insulina no aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-A e IR-B en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina	115
Figura 38	El aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-A es vía activación de receptores de adenosina A _{2A}	127

Figura 39	Insulina recupera el transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-A en presencia de un antagonista de receptores de adenosina A _{2A} .	129
Figura 40	El aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> es revertido en presencia de un antagonista de receptores de adenosina A _{2A} .	131
Figura 41	Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-A de manera dependiente de receptores de adenosina A ₁	133
Figura 42	El aumento transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-A e IR-B solo se bloqueó en presencia de un antagonista de receptores de adenosina A _{2A} .	135
Figura 43	Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-A e IR-B de una manera dependiente de receptores de adenosina A ₁	137
Figura 44	Insulina requiere de la ctividad de receptores de adenosina A ₁ para revertir el aumento de la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional	149
Figura 45	Insulina no aumenta la abundancia de proteína en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-A y no es modificado por agonistas y antagonistas de receptores de adenosina A ₁ y A _{2A}	151
Figura 46	Insulina no aumenta la abundancia de proteína en HUVEC normales <i>knockdown</i> para IR-B y no es modificado por agonistas y antagonistas de receptores de adenosina A ₁ y A _{2A}	152
Figura 47	Insulina revierte el aumento de la abundancia de proteína de hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-B, requiriendo la actividad de receptores de adenosina A ₁	153
Figura 48	Insulina revierte el aumento de la abundancia de proteína de hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional <i>knockdown</i> para IR-B	154
Figura 49	Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A ₁ para aumentar niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC normales	155
Figura 50	Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A _{2A} para aumentar niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC normales	156
Figura 51	Insulina requiere de IR-A, y receptores de adenosina A ₁ para revertir el aumento de los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional	157
Figura 52	Insulina requiere de IR-A, y no de receptores de adenosina A _{2A} para revertir el aumento de los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional	158
Figura 53	Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A ₁ para aumentar la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC normales	160
Figura 54	Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A _{2A} para aumentar la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC normales	161
Figura 55	Insulina requiere de IR-A, y de receptores de adenosina A ₁ para	162

	revertir el aumento de la actividad transcripcional del promotor <i>SLC7A1</i> en HUVEC con diabetes gestacional	
Figura 56	Insulina requiere de IR-A, y no de receptores de adenosina A _{2A} para revertir el aumento de la actividad transcripcional del promotor de <i>SLC7A1</i> en HUVEC con diabetes gestacional	163
Figura 57	Insulina revierte el aumento en la unión de Sp1 a su elemento de respuesta en el promotor de hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional	165
Figura 58	Insulina requiere de IR-A e IR-B, y de receptores de adenosina A _{2A} para aumentar la unión de Sp1 a su elemento de respuesta en el promotor de hCAT-1 en HUVEC normales	166
Figura 59	Insulina requiere de IR-A y de receptores de adenosina A ₁ para revertir el aumento de la unión de Sp1 a su elemento de respuesta en el promotor de hCAT-1 en HUVEC con diabetes gestacional	167
Figura 60	Modelo propuesto del efecto de diabetes gestacional sobre la expresión y actividad de hCAT-1	175
Figura 61	Modelo propuesto del efecto de insulina sobre la expresión y actividad de hCAT-1 en diabetes gestacional	178
Figura 62	Modelo propuesto del efecto de insulina vía IR-A sobre la expresión y actividad de hCAT-1 en diabetes gestacional	182
Figura 63	Modelo propuesto de la regulación del efecto de insulina vía IR-A por la activación del receptor de adenosina A ₁ sobre la expresión y actividad de hCAT-1 en diabetes gestacional	188

Índice de Tablas

		<i>Pág</i>
Tabla 1	Constantes de inhibición para agonistas y antagonistas de receptores de adenosina	12
Tabla 2	Regulación del efecto de insulina por agonistas/antagonistas de receptores de adenosina	25
Tabla 3	Criterios de selección de muestras biológicas	33
Tabla 4	Secuencias de oligonucleótidos para PCR no cuantitativo y cuantitativo	41
Tabla 5	Características clínicas de las madres y recién nacidos	53
Tabla 6	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en HUVEC	57
Tabla 7	Efecto del silenciamiento de las isoformas del receptor de insulina sobre los parámetros cinéticos del transporte de L-arginina saturable en HUVEC	73
Tabla 8	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina por activación de receptores de adenosina en HUVEC provenientes de embarazos normales	85
Tabla 9	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina por activación de receptores de adenosina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional	92
Tabla 10	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC normales <i>knock-down</i> para IR-A	117
Tabla 11	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC normales <i>knock-down</i> para IR-B	120
Tabla 12	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC normales <i>knock-down</i> para IR-A e IR-B	123
Tabla 13	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC con diabetes gestacional <i>knock-down</i> para IR-A	139
Tabla 14	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC con diabetes gestacional <i>knock-down</i> para IR-B	142
Tabla 15	Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC con diabetes gestacional <i>knock-down</i> para IR-A e IR-B	145

Abreviaturas

ADA	<i>American diabetes association</i>
AGA	<i>Adequate for gestational age</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
eNOS	<i>Endotelial nitric oxide synthase</i>
HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IGFR	<i>Insulin growth factor receptor</i>
KLF	<i>Krupel like factor</i>
LGA	<i>Large for gestational age</i>
NBTI	<i>Nitrobenzyl thioinosine</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
SLC7A1	<i>Solute carrier 7A1</i>
TGF	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis factor α</i>
UTR	<i>Untranslate region</i>

Resumen

Diabetes gestacional (DG) aumenta el transporte de L-arginina en la macrocirculación de la placenta. Insulina activa receptores de insulina (IRs) los cuales estimulan el transporte de L-arginina via transportadores de aminoácidos catiónicos tipo 1 humano (hCAT-1) y la síntesis de óxido nítrico en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) de embarazos normales, pero reduce el aumento inducido por DG sobre el transporte de L-arginina. Este efecto de insulina podría resultar de una expresión y activación diferencial de las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina, involucrando mecanismos transcripcionales asociadas a la activación de la proteína específica 1 (Sp1). Como se ha propuesto que los efectos biológicos de insulina son regulados por receptores de adenosina, en este estudio se analizó si el aumento de la expresión y actividad de hCAT-1 causado por DG es bloqueado por insulina mediante activación diferencial de IR-A y/o IR-B, un mecanismo regulado por activación de receptores de adenosina en cultivos primarios de HUVEC. La actividad del transporte de L-arginina, la expresión de hCAT-1 y la unión de Sp1 están aumentadas en DG, efecto que es revertido por insulina. El efecto de insulina en DG requirió de la actividad de receptores de adenosina A₁, un fenotipo que fue similar al observado en células *knock-down* para IR-B. En HUVEC normales, insulina aumentó la actividad del transporte de L-arginina, la expresión de hCAT-1 y la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*, efectos que requirieron de la actividad del receptor de adenosina A_{2A}. Sin embargo, el efecto de insulina fue bloqueado en HUVEC *knock-down* para IR-A y/o IR-B. En conclusión, insulina revierte el efecto de diabetes gestacional vía IR-A sobre la actividad y expresión de hCAT-1, un mecanismo dependiente de receptores de adenosina A₁ en HUVEC de DG. Sin embargo, insulina aumenta la actividad y expresión de hCAT-1, dependiendo de la actividad de receptores de adenosina A_{2A} en HUVEC de embarazos normales.

Abstract

Gestational diabetes (GD) increases L-arginine transport in the placenta macrocirculation. Insulin activates insulin receptors (IRs) which stimulate L-arginine transport via human cationic amino acids transporters type 1 (hCAT-1) and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) from normal pregnancies, but insulin reduces GD-increase L-arginine transport. This insulin effect could be a result of differential expression and activation of the insulin receptor isoforms A (IR-A) and B (IR-B), involving transcriptional mechanisms associated with specific protein 1 (Sp1). As it has been proposed that the biological effects of insulin are regulated by adenosine receptors, in this study we analyzed whether insulin reverses GD-increase hCAT-1 activity and expression through differential IR-A and/or IR-B activation and this mechanism is regulated by adenosine receptors in HUVEC. Herein, we demonstrated that L-arginine transport activity, hCAT-1 expression and Sp1-binding to promotor *SLC7A1* are increased in GD, effects reverse by insulin. This insulin effect requires A₁ adenosine receptor activity in GD, a phenotype that was similarly observed in cells *knocked-down* for IR-B. In normal HUVEC, insulin increased L-arginine activity, hCAT-1 expression and Sp1-binding to promotor *SLC7A1*, effects that required adenosine receptor A_{2A} activity. However, these insulin effects were blocked in HUVEC *knock-down* for IR-A and/or IR-B. In conclusion, insulin via IR-A reverses the GD-increase in hCAT-1 activity and expression, a mechanism that is A₁-adenosine receptor dependent in GD derived cells. However, insulin increases hCAT-1 activity and expression, through an A_{2A}-adenosine receptor dependent mechanism in HUVEC from normal pregnancies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes gestacional

Diabetes gestacional es un síndrome caracterizado por intolerancia a la D-glucosa, de severidad variable que se inicia o es diagnosticada durante el embarazo, generando un estado de hiperglicemia; que por lo general termina después del parto (Metzger y cols., 2007; Reece y cols., 2009; ADA, 2012). Esta patología ha sido asociada con un desarrollo fetal anormal y complicaciones perinatales, como macrosomía, hipoglicemia neonatal, y desórdenes neurológicos (Nold & Georgieff, 2004). Diabetes gestacional es una patología de alta incidencia durante la gestación, dependiendo de los criterios utilizados, variando entre un 5 y 15% del total de mujeres embarazadas en la población chilena (Belmar y cols., 2004; Huidobro y cols., 2004). Los principales factores de riesgo para predecir el desarrollo de diabetes gestacional son aumento en la edad de maternidad, sobrepeso antes del embarazo, antecedentes de diabetes gestacional en el primer embarazo e historia de intolerancia a la D-glucosa (Morisset y cols., 2010; Ijas y cols., 2013). Las manifestaciones clínicas de la diabetes gestacional han sido atribuidas a las condiciones de hiperglicemia, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, y disfunción endotelial fetal (Nold & Goergieff, 2004, Greene & Solomon, 2005, Westermeier y cols., 2009; Sobrevia y cols., 2011; Westermeier y cols., 2011; Salomón y cols., 2012). Diabetes gestacional es un factor de riesgo asociado a enfermedades cardiovasculares, aumentando si existe además hipertensión arterial, dislipidemia y aterosclerosis (Niswender, 2010; Leiva y cols., 2013). Además, diabetes gestacional aumenta la vasodilatación dependiente del endotelio con respecto a lo observado en normales, lo cual es considerado un marcador de disfunción endotelial (De Vriese y cols., 2000; Westermeier y cols., 2011; Salomón y cols., 2012).

1.1.1 Efecto de la diabetes gestacional sobre la función endotelial

Diabetes gestacional genera alteraciones estructurales y funcionales, incluyendo la disfunción endotelial de la micro y macrocirculación placentaria (Tchirikov y cols., 2002; Biri y cols., 2006; Sobrevia y cols., 2011; Westermeier y cols., 2011; Salomón y cols., 2012), observándose una regulación alterada del tono vascular en la circulación feto-placentaria (Berholm y cols., 2003; San Martin & Sobrevia, 2006; Casanello y cols., 2007; Sobrevia y cols., 2011), aún sin existir una claridad con respecto a los mecanismos de la disfunción endotelial asociados a este síndrome (Sobrevia y cols., 2011). El segmento distal del cordón umbilical y la placenta son lechos vasculares donde no existe inervación (Marzioni y cols., 2004), por lo tanto, una regulación local del tono vascular resulta de una equilibrada combinación de la síntesis, liberación y bioactividad de vasodilatadores (i.e., óxido nítrico, prostaglandinas, adenosina) y vasoconstrictores (i.e., endotelina 1), derivados del endotelio (Olsson & Pearson, 1990; Becker y cols., 2000).

Se ha reportado que en arterias y venas de la placenta humana provenientes de embarazos con diabetes gestacional existe un aumento en la síntesis de óxido nítrico (NO) (Figueroa y cols., 2000). Además, el mismo resultado se obtuvo a partir de cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) obtenidos desde pacientes diagnosticados con diabetes gestacional (Sobrevia y cols., 1995). Por lo tanto, el aumento de la vasodilatación observada en esta patología puede ser consecuencia de un aumento en la síntesis de NO y su biodisponibilidad en la circulación placentaria humana (Sobrevia y cols., 2011). Incluso cuando la disfunción endotelial se asocia a diabetes gestacional, este es referido como una alteración de la síntesis de NO y de la captación del aminoácido catiónico L-arginina (i.e., ruta L-arginina/NO) (Sobrevia y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2013). La mayoría de los estudios no son concluyentes con

respecto a los mecanismos detrás de estos efectos de la diabetes gestacional. Sin embargo, es aceptado que es el resultado de la alteración de múltiples mecanismos metabólicos, incluyendo la sensibilidad del endotelio fetal humano a las moléculas vasoactivas como adenosina (Vásquez y cols., 2004; San Martín & Sobrevia, 2006; Salomón y cols., 2012; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012; 2013).

1.2 Transporte de L-arginina

El transporte de L-arginina en células humanas comprende a diferentes sistemas de transportadores de aminoácidos entre ellos al sistema y^+ (alta afinidad, transporte independiente de Na^+) y los transportadores dependientes de Na^+ ($b^{0,+}$, $B^{0,+}$, e y^+L) (San Martín & Sobrevía, 2006; Wu, 2009). La familia y^+ está compuesta de 5 miembros de transportadores de aminoácidos catiónicos (CATs: *cationic amino acids transporters*) CAT1, CAT2A, CAT2B, CAT3 and CAT4 (Closs y cols., 2006; Grillo y cols., 2008), considerados como el principal mecanismo de transporte de L-arginina en diversos tipos celulares (Tong & Barbul, 2004). CAT-1 se expresa, con mayor y menor abundancia, en diversos tipos celulares; exceptuando el caso del hígado, donde no se reporta su expresión (Verrey y cols., 2004). El sistema CAT-1 es considerado el principal transportador de L-arginina en la placenta (Grillo y cols., 2008).

En HUVEC se ha demostrado que el transporte de L-arginina es mediado por los sistemas hCAT-1 (~80% del transporte de L-arginina total) y hCAT-2B (~20% del transporte de L-arginina total) humanos (Casanello & Sobrevia, 2002; González y cols., 2004, 2011a; Verrey y cols., 2004). En células endoteliales de la microvasculatura de la placenta se han descrito los sistemas y^+ e y^+L , CAT-1 y 4F2hc, respectivamente (Dye y cols., 2004). Además, se ha descrito que el transporte de L-arginina en estos tipos celulares

es mediado por el sistema B^{0,+} (Pann y cols., 1995). En otros modelos endoteliales, como por ejemplo el de la vena safena humana (HSVECs: *human saphenous vein endothelial cells*) se ha descrito la expresión de CAT-2B, el cual puede ser activado por una ruta dependiente de PKC (Visigalli y cols., 2007), y en células endoteliales de la arteria pulmonar humana (hPAEC: *human pulmonary artery endothelial cells*) se ha descrito la expresión de CAT-1, el cual es el responsable del 70-95% de la captación de L-arginina (Sergey y cols., 2003).

1.2.1 Transportador de aminoácidos catiónicos tipo 1 (hCAT1)

hCAT1 pertenece al sistema de transporte y⁺ el cual se caracteriza por ser independiente de Na⁺ y de pH (Deves & Boyd, 1998; Closs y cols., 2006). Este transportador presenta valores de K_m para L-arginina, L-lisina, y L-ornitina entre 100 y 150 μ M, y es fuertemente estimulado por el sustrato en el lado *trans* de la membrana (Closs y cols., 2006). Además, hCAT-1 puede ser estimulado por hiperpolarización de la membrana (Closs y cols., 2006). El gen que codifica para esta proteína es el *SLC7A1* el cual se ubica en el cromosoma 13q12-q14 (Albritton y cols., 1992; Hammermann y cols., 2001) está formado por 13 exones y 11 intrones, de los cuales los exones (-1) y (-2) son no-traducibles (Hammermann y cols., 2001; Sobrevia & González 2009), ubicando el inicio de la transcripción (ATG) en el exón +1 (Sobrevia & González 2009, González y cols., 2011a).

1.2.2 Regulación del transporte de L-arginina vía hCAT1

El transporte de L-arginina vía hCAT-1 está sujeto a regulación por diferentes agentes o condiciones (Sobrevia & González, 2009; González y cols., 2011a).

En HUVEC se ha determinado que la expresión de hCAT-1 aumenta en presencia de algunas citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Irie y cols., 1997; Visigalli y cols., 2007) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Vásquez y cols., 2007), en presencia de radicales libres como el anión superóxido (O_2^-) (González y cols., 2011b), de la hormona insulina (González y cols., 2011a; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012), de la activación de receptores de adenosina del tipo A_{2A} (Vásquez y cols., 2004; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012), o altas concentraciones extracelulares de D-glucosa (25 mM) (Vásquez y cols., 2007), siendo los últimos tres componentes asociados a diabetes gestacional (San Martín & Sobrevia, 2006). Cabe destacar, que HUVEC proveniente de embarazos de diabetes gestacional poseen mayor expresión hCAT-1 (Vásquez y cols., 2004; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012). Sin embargo, también se ha mostrado que existe disminución de la expresión de hCAT-1, por ejemplo en hipoxia (Casanello y cols., 2007; 2009; Prieto y cols., 2011), y en presencia del miR-22 (microRNA derivado del hígado) (Jopling y cols., 2006; Bhattacharyya y cols., 2006; Cicera y cols., 2010).

1.2.3 Regulación de la expresión de *SLC7A1*

La organización génica de los transportadores CAT, está conformada por dos subfamilias conformadas por los transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT) y los transportadores de aminoácidos asociados a glicoproteínas (HAT). La familia de transportadores de aminoácidos catiónicos son codificados por los genes *SLC7A* (1-4) y corresponden a proteínas con 14 dominios transmembrana (Verrey y cols., 2004).

Entre los genes que codifican para CAT-1 en rata, ratón y humano existen características comunes: la región promotora carece de caja TATA, poseen múltiples sitios

de unión a la proteína específica 1 (Sp1) y tienen una extensa región 3' no traducible (3'UTR) que podrían cumplir funciones en la regulación de la estabilidad del mRNA o en la traducción (Aulak y cols., 1996; 1999; Fernández y cols., 2003; Hatzoglou y cols., 2004).

SCL7A1 posee múltiples sitios de consenso para el factor transcripcional, Sp1 (ver Figura 1), el cual puede ser regulado por insulina o en procesos inflamatorios (Sobrevia & González 2009; González y cols., 2011). En HUVEC sólo se ha descrito que insulina aumenta la actividad transcripcional de *SCL7A1* (González y cols., 2011a; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012), un mecanismo dependiente del factor transcripcional Sp1 (entre -177 y -105 pb desde el ATG), sin estudios descritos en diabetes gestacional.

El factor transcripcional Sp1 pertenece a la súper familia de Sp/Factor tipo Krupel (Sp/KLF), que se divide en las subfamilias Sp, con 8 miembros (Sp1 – Sp8) y la subfamilia KLF, con 15 miembros (Solomon y cols., 2008). Luego, la subfamilia Sp se subdivide en dos grupos nuevamente Sp1-Sp4 (604-785 aminoácidos) y Sp5-Sp8 (394-452 aminoácidos), siendo este último grupo una versión truncada de Sp1 (Solomon y cols., 2008; Wierstra, 2008). La proteína Sp1 posee dos dominios de activación transcripcional, adyacente a estos sitios posee sitios ricos en Serinas y treoninas (S/T) que permiten modular el efecto de Sp1 de manera postraduccional, y en el dominio del extremo COOH terminal posee sitios de interacción con represores o activadores transcripcionales (Solomon y cols., 2008; Wierstra 2008). En los dominios ricos en serinas y treoninas, posee varios sitios de consenso para diferentes quinasas, que incluyen quinasas de calmodulina (CamK), quinasas de caseína (CK), proteína quinasa A (PKA), PKC, y p42/44^{mapk} (Samsons y cols., 2002; Sobrevia & González 2009). Se ha observado que insulina favorece la actividad de Sp1 en hepatoblastoma humano (células HepG2), donde

-1606	CTAAGCCATCTGCATGTGTTTCATTA AAAACTTTTTCTGGGGACTTTTTCTGGCTCATCCCTGTAGTCC
-1539	CGATGCTAGGGGAGGTTGAGGCAAAATGATCGCTAGACAGCTGGTATTTGAGGCCAGCCTATGCAACATATCA
-1466	AAAACCCGTGTCTATATGTAGAAAAAATATTA ACTAGGCGTGATGACACAAGCCTGTAGTTCCATCTGCTTGG
-1393	GAGGCTGAGGCAGGAGGATGGCTTGAGCCTGGGAATTTGAAGTTCAGTGAGCTATGATTGTACCGCTGCATT
-1320	CCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACCCCTGTCTCT AAAAAACAAACAAATGACAACAGCAACAACAACAGAACA Sp1
-1247	CTTTTTCTGAAGCTAGCACCATGCAGTTATGTACTTTATAAATTGCTAGTCTAATTC CAAGGGAATAGTTCAG
-1174	CAGCTGATATTTGAGAAGGACCTGTAGAAAGGATTCAAAGACCACGGACACCGTCCACTGTTTTCTGTTTTTC
-1101	CTATAAGATAGAAGAAGGATGGCATTATTAATTTATGCCCTGTTTACCTATCCCAAGTCC CAGATCACTGGAT
-1028	CTTTAAAGATTATGATTCTCGCTTGGCTTTTGGTACAAAAGGAGACAAGGAGGGAGCTTAA AAGGTGAGCACC
-955	GTGTGATTCAGGACTGAAGCTTCTGCCACTTCTGGGGGTA ACTGCAAAAGTGAGCCGTTCTGACTAGCCGT
-882	TTGTGCATTTGCCACTGCCAAGGGGGCACAGGTAGATTCAAGCTTTGGGGCTCTTCTGACA ACTGGCAAGGAT
-809	AAGGTATTAGCAAGGGCAAAGGAATAGTAATAAAATAATCCAATAACAAAGACATGAAGATT TATAATAATTT
-736	TTAGGCCGGTGCAGTGTTTCAGGACTGTAATCCTAGGGCGCTTTGGGAGGCCAGGCGGGAGGATCGCTT GAG
-663	GCCAGGATTTGAGGTTAAGGTGAACTGCGCTCCAGCCTGGGCAATAGAGTAACACCCTGTCTCT AAAAATGAA
-590	AAGAAAACAGTTTAAACCTTTTAAGTGCATACCAAATCTTTTATTTTGGAGAAGGAAA ACTGGTCTCGAGTTC
-517	CGTGTGAGCTCCCTGGGGCCCGCGGGAGGGGTTGGCACGGCCGGACCTGCAGCACTAGTTCTGGCCAGGGC
-444	GCTGTGGGATCTGCAGGGGACCACAGGATGCTGTGGCGGGTGCGCTCAGATTGGCGGAGAAA CGGCCACAG
-371	CCTACGGAGCTACTGAGAAGGCGAGCGGAGGCGCAGCCCGCCCGCCCGCGGGAACCCAGGTTGGGGCGC
-298	TGGGCGCGGAAGACTCAGCCGCCCGCCACCA AGGGCGCGTCCGGTCCCGGCCGAGCCTCTGGGCTGGCA Sp1

(Figura 1 continúa en la página 8)

-225	GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCCATTGGTGCCCGGCGGTGACGCGGCCGAGCGGGCCGGGGCTGCCTGGTCCGG	Sp1
-152	GGCGGGCGTGGGGCGGGGGCGGAGCGCGAGGGGGCGGGGGCGGGCGCACTGCTGATGAAACCTGGCGCC	Sp1 Sp1
-79	GGAACCCGCCAGCCCTCGGCGCCATTTCAGTCCGCGCAGGCAGGTGTGAGCAGCGGGTCAACTACCTGGCAGG	
-6	CGCGCACGCGGCCGCCGGGCTCCCGCTAACCGCAGCCTCCACTCCTCTCCCGCGCGCCGCGCCCCGCCCGC	Exón -2
+67	CCCGCCCCCGGTCTCGCGGCCGAGCGTCCGTTGGTCTTGAGCGGTCCGACAGTCTGTCTGTTCGCGA	Exón -2
+134	TCCTGCCGAGCCCCGCCGCCGGCTTGGATTCTGAAACCTTCCTTGTATCCCTCCTGAGACATCTTTGCT	Exón -1
+208	GCAAGATCGAGGCTGTCTCTGGTGAGAAGGTGGTGGAGGCTTCCCGTCATATTCAGCTCTGAACAGCAACATG	Exón -1

Figura 1. Esquema de la región promotora desde -1606 pb desde el sitio de inicio de la transcripción de *SCL7A1*. Secuencia de la región de -1606 pb desde el inicio propuesto de la transcripción (*) del promotor de *SCL7A1* (para transportador de aminoácidos catiónicos tipo 1, hCAT-1) que ha sido clonado. Además, se incluyen dos exones no traducibles (exones -2 (gris oscuro) y -1 (gris claro)) antes del codón de inicio (ATG). En verde se destacan los sitios de unión del factor de transcripción Sp1.

aumenta la transcripción de genes como el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Banfi y cols., 2001), y la lipoproteína Apo A1 (Murao y cols., 1998, Lam y cols., 2003); y en músculo esquelético L6 se ha demostrado que insulina induce la expresión de PKC δ , siendo un mecanismo dependiente de Sp1 (Horovitz-Fried y cols., 2007).

1.2.4 Efecto de la diabetes gestacional sobre el transporte de L-arginina en HUVEC

Se ha reportado que los niveles de NO en líquido amniótico (von Mandach y cols., 2003) y la síntesis de NO en venas y arterias placentarias (Figuroa y cols., 2000) están aumentados en diabetes gestacional. Estudios tempranos realizados en cultivos primarios de HUVEC aislados desde embarazos con diabetes gestacional mostraron un aumento en la síntesis de NO y en la actividad del transporte de L-arginina (Sobrevia y cols., 1995, 1997). Estos resultados fueron asociados con un mayor número de copias del mRNA, nivel de proteína total y actividad de la eNOS (Vásquez y cols., 2004; Farías y cols., 2006, 2010; Westermeier y cols., 2011). Además, HUVEC obtenidas desde embarazos de diabetes gestacional muestran un alto número de copias para hCAT1 (Vásquez y cols., 2004). De manera interesante, HUVEC incubadas en presencia de alta D-glucosa muestran mayor síntesis de L-citrulina a partir de L-arginina (indicador de actividad de NOS), y niveles de cGMP intracelular (indicador de bioactividad de NO) (Sobrevia y cols., 1997; González y cols., 2004, 2011a). En este fenómeno se ha propuesto como mecanismos de señalización celular involucrados las rutas de PKC y p42/p44^{mapk} (Montecinos y cols., 2000; Flores y cols., 2003). Así, en diabetes gestacional hay un aumento en los niveles de NO asociado con un aumento del transporte de L-arginina.

En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, insulina reduce el aumento del transporte de L-arginina observado en este tipo celular comparado con

HUVEC obtenidos desde embarazos normales (Sobrevia y cols., 1998). Además, se observó que en presencia de insulina se redujo el incremento de la síntesis de NO (expresado como acumulación de cGMP) (Sobrevia y cols., 1998).

Otras moléculas vasoactivas, tal como adenosina, pueden aumentar el transporte de L-arginina y la actividad de la eNOS (Vásquez y cols., 2004; San Martín & Sobrevia 2006; Farías y cols., 2006, 2010; Westermeier y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012). Se ha observado *in vitro* que los niveles de adenosina en el medio de cultivos de HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional (2.5 μ M) son mayores que las HUVEC provenientes de embarazos normales (50 nM) (Vásquez y cols., 2004; Westermeier y cols., 2011). Además, en HUVEC de embarazos normales incubadas con nitrobenziltioinosina (NBTI, inhibidor del transporte de nucleósidos) aumenta el transporte de L-arginina, indicando que el aumento de adenosina extracelular y potencialmente la activación de receptores de adenosina están involucrados en el aumento del transporte de L-arginina (San Martín & Sobrevia, 2006; Westermeier y cols., 2009; Sobrevia y cols., 2011).

1.3 Receptores de adenosina

Adenosina es un nucleósido purínico implicado en diversas funciones biológicas, tales como biosíntesis de nucleótidos o el metabolismo energético celular (Eltzschig, 2009). Además, es un mediador de la vasodilatación de la circulación coronaria, cerebral y muscular, en varias condiciones incluyendo hipoxia y el ejercicio (Berne y cols., 1983). La adenosina extracelular es una molécula de señalización que puede activar receptores de adenosina. Los receptores de adenosina, pertenecientes a la familia P₁ de los receptores purinérgicos, están acoplados a proteína G y se han descrito al menos 4 subtipos: A₁, A_{2A},

A_{2B} y A₃ (Fredholm y cols., 2001, 2007, 2011; Burnstock y cols., 2006, 2010). La estimulación de los receptores de adenosina genera diferentes efectos biológicos los cuales dependen de su patrón de expresión y disponibilidad en la membrana de un tipo celular o tejido en particular (Liu y cols. 2002; Wyatt y cols. 2002; Feoktistov y cols., 2002). El extremo N-terminal es relativamente corto (7 a 13 residuos), comparado con su C-terminal (32 a 120 residuos) (Burnstock, 2006). Los dominios transmembranas de los receptores de adenosina humanos, poseen entre un 39–61% de identidad en su secuencia, y un 11-18% de identidad con los receptores de la familia P2 (receptores de ATP) (Burnstock, 2006).

Cambios en el patrón de expresión de receptores de adenosina durante condiciones fisiopatológicas como la hipoxia, isquemia o en inflamación generan una alteración significativa en su señalización de los receptores de adenosina (Burnstock y cols., 2010, Fredholm y cols., 2011). Los receptores A₁, A_{2A} y A₃ son activados a concentraciones nanomolares de adenosina, mientras que se necesitan concentraciones micromolares para activar los receptores A_{2B}, existiendo diferentes fármacos usados como agonistas y antagonistas para estos receptores (Tabla 1) (Fredholm y cols., 2001; 2011; Schulte & Fredholm, 2003; Eltzhig, 2009; Mundell & Kelly, 2010). Los receptores A₁ y A₃ son clásicamente denominados como receptores inhibidores acoplados a proteína G_i/G_o (preferencialmente G_i para receptor A₁); por otro lado, A_{2A} y A_{2B} son conocidos como receptores activadores acoplados a proteína G_s (Klinger y cols., 2002). Los mecanismos de señalización asociados a la activación de los receptores A₁ y A₃ incluyen inhibición de la adenilil ciclasa, activación de fosfolipasa C (PLC) y activación de la ruta PI3k/Akt, mientras que la activación de receptores A_{2A} y A_{2B} induce activación de la adenilil ciclasa (Eltzhig, 2009; Fredholm y cols., 2011). Todos los receptores de adenosina estimulan MAPK a través de una vía de señalización que difiere del tipo de receptor que ha sido

Tabla 1. Constantes de inhibición (K_i) para agonistas y antagonistas de receptores de adenosina

<i>Agonista/Antagonista</i>	A_1	A_{2A}	A_{2B}	A_3	<i>Modelo</i>	<i>Referencias</i>
Adenosina	100	310	5000	290	CHO	Fredholm y cols., 1998
NECA	14	20	-	-	CHO	Salvatore y cols., 1993
NECA	-	-	-	25	CHO	Klotz y cols., 1998
NECA	-	-	330	-	HEK293	Linden y cols., 1999
CGS21680	290	27	88800	67	CHO	Klotz y cols., 1998
2Cl-IB-MECA	220	5360	-	1.4	CHO	Jacobson & Gao. 2006
2Cl-IB-MECA	-	-	>10000	-	HEK293	Kim y cols., 2000
DPCPX	3.9	129	1010	4000	CHO	Klotz y cols., 1998
MRS1754	400	500	2	570	HEK293	Kim y cols., 2000
ZM241385	260	0.8	-	>10000	CHO	Ongini y cols., 1999
ZM241385	-	-	32	-	HEK293	Linden y cols., 1999
MRS1523	>10000	3660	-	18.9	CHO	Jacobson & Gao. 2006
MRS1523	-	-	>10000	-	HEK293	Ling y cols., 2010

NECA: 5'-N-etilcarboxiamidoadenosina, CGS21680: 3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbamoil)-3,4-dihidroxi-oxolano-2-il]purin-2-il]amino]etil]fenil] ácido propanoico, 2Cl-IB-MECA: 1-[2-Cloro-6-[[[(3-iodofenil)metil]amino]-9H-purin-9-il]-1-deoxi-N-metil-β-D-ribofuranuronamida, DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina, ZM-241385: 4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol, MRS1523: 3-propil-6-etil-5-[(etiltio)carbonil]-2 fenil-4-propil-3-piridina carboxilato.

activado y del tipo celular (Klinger y cols., 2002; Schulte & Fredholm, 2003; Eltzschig, 2009).

La activación de receptores de adenosina depende del nivel extracelular de este nucleósido, el cual es regulado principalmente por transportadores de adenosina (Baldwin y cols., 2004; Burnstock, 2006; Westermeier y cols., 2009; Burnstock y cols., 2010; Sobrevia y cols., 2011). En HUVEC la adenosina extracelular es captada principalmente por transportadores de nucleósidos de tipo equilibrativos (ENTs) (Westermeier y cols., 2009; Sobrevia & González, 2009; Sobrevia y cols., 2011). Sin embargo, no se conoce el papel que estos transportadores pudieran estar jugando en el endotelio diferenciado en el feto o adulto.

Diversos estudios demuestran los efectos vasculares de adenosina, incluyendo el aumento de la relación entrega/demanda de oxígeno en el corazón debido a la vasodilatación de arterias coronarias seguido a la activación de receptores A_{2A} (Shryock y cols., 1998; Sundell y cols., 2003), o reducción de la liberación de norepinefrina y disminución de la resistencia periférica vascular por activación de receptores A_1 en el nervio simpático de rata (Burgdorf y cols., 2001, 2005). Se ha demostrado en ratones *knock-out* para el receptor A_1 , que adenosina induce mayor relajación de la aorta, y que la inhibición del receptor A_{2B} en estas ratas genera vasoconstricción (Wang y cols., 2010).

1.3.1 Rol de los receptores de adenosina en la diabetes gestacional

El efecto vasodilatador de adenosina dependiente de NO, generado por el endotelio es mediado por la expresión de receptores de adenosina (Sobrevia & Mann, 1997; Edmunds & Marshall, 2003; Vásquez y cols., 2004; San Martín & Sobrevia, 2006; Ray & Marshall, 2006; Casanello y cols., 2007; Escudero y cols., 2008, 2009; Westermeier y cols., 2009; Sobrevia y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2013), un efecto de

relevancia particular y que se observa aumentado en cultivos primarios de HUVEC obtenidos desde embarazos con diabetes gestacional (Vásquez y cols., 2004; San Martín & Sobrevia, 2006; Casanello y cols., 2007; Westermeier y cols., 2009; Farias y cols., 2006, 2010) o en HUVEC obtenido desde embarazos normales expuestas *in vitro* a alta D-glucosa (Muñoz y cols., 2006; Puebla y cols., 2008). La unión funcional entre adenosina y la ruta L-arginina/NO en HUVEC ha sido denominada vía ALANO (i.e., Adenosine/L-Arginine/Nitric Oxide) (San Martín & Sobrevia, 2006). Este mecanismo ha sido propuesto como un nuevo elemento para entender la disfunción endotelial en condiciones de hiperglicemia, y eventualmente en patologías asociadas a hiperglicemia, como por ejemplo la diabetes gestacional (Pandolfi & Di Pietro, 2010).

El aumento de la actividad de la ruta ALANO en diabetes gestacional implica la acumulación extracelular de adenosina, dado por una disminución de la captación de este nucleósido a nivel endotelial (Vásquez y cols. 2004; Farías y cols., 2006, 2010). Es decir, los cambios en la concentración plasmática de adenosina en la circulación fetoplacentaria pueden resultar en una alteración del control del flujo sanguíneo en la placenta como una respuesta adaptativa y/o de protección del feto a este síndrome (Westermeier y cols., 2009; Sobrevia y cols., 2011). Existen reportes que sugieren que la resistencia de los vasos umbilicales (medido como velocidad del flujo por Doppler) no está significativamente alterada en diabetes gestacional (Brown y cols. 1990; Biri y cols. 2006; Pietryga y cols. 2006), pero cabe destacar que no hay información sobre la reactividad arterias umbilicales, y vasos coriónicos provenientes de embarazos con diabetes gestacional (Biri y cols., 2006; Casanello y cols., 2007; Sobrevia y cols., 2009), pero en vena umbilical la relajación mediada por insulina está disminuida en diabetes gestacional (Westermeier y cols., 2011), indicando un grado de resistencia a insulina en este lecho vascular. Se ha

informado que los niveles plasmático de adenosina en sangre de vena umbilical son mayores en recién nacidos de embarazos con diabetes gestacional comparados con los recién nacidos de embarazos normales (Westermeier y cols., 2011). Estos resultados se complementan por estudios que muestran un aumento de la concentración de adenosina detectada en sangre de vena umbilical desde embarazos con diabetes mellitus comparado con embarazos normales (Maguire y cols., 1998) o en cultivos primarios de HUVEC aislados desde embarazos con diabetes gestacional (Vásquez y cols., 2004; Farías y cols., 2006, 2010).

También se ha informado que los niveles de nitrato y nitrito (un indicador indirecto de NO) en el líquido amniótico en diabetes gestacional es mayor que en embarazos normales, sugiriendo que la actividad NOS está activada en el feto (von Mandach y cols., 2003). Este fenómeno podría deberse a un elevado nivel de adenosina en la circulación fetoplacentaria (Sobrevia y cols., 2011; Westermeier y cols., 2011). Aun cuando estas observaciones se han hecho, no existe una correlación publicada de los niveles plasmáticos de adenosina y la disfunción endotelial en embarazos con diabetes gestacional (Baldwin y cols., 2004; San Martín & Sobrevia, 2006; Casanello y cols., 2007; Westermeier y cols., 2009; Sobrevia y cols., 2011). Un estudio en nuestro laboratorio muestra que un inhibidor del transporte de adenosina (NBTI) (Baldwin y cols., 2004) induce vasodilatación en anillos de vena umbilical (Vega y cols., 2009), y al utilizar ZM-241385 se bloquea el efecto de adenosina e incrementa el tono basal en estos vasos (Westermeier y cols., 2011), sugiriendo la participación de adenosina sobre la modulación del tono vascular en este tipo de vasos (Sobrevia y cols., 2011). La posibilidad que adenosina esté tónicamente actuando como un agente vasodilatador en este lecho vascular (Westermeier y cols., 2011) está también apoyada por resultados en publicaciones (Cifuentes y cols., 2010; Sepúlveda y

cols., 2010) donde se muestra que (a) adenosina previene la contracción inducida por hidroxitriptamina (5HT) de anillos de vena umbilical obtenidos desde embarazos normales, (b) adenosina no cambia la contracción inducida por 5HT en vasos de embarazos con diabetes gestacional y (c) que al usar un antagonista relativamente específico para el receptor A_{2A} (ZM-241385), éste bloquea el efecto de la diabetes gestacional sobre la contracción inducida por 5HT. Actualmente, sólo se ha informado un estudio destacando la acción potencial de adenosina como modulador de la reactividad vascular fetoplacentaria en diabetes gestacional (Westermeyer y cols., 2011). En este estudio se sugiere que debido a que en diabetes gestacional se observa un aumento en la concentración de adenosina en el plasma fetal, la reactividad vascular en la circulación fetoplacentaria podría resultar de una acción biológica alterada de adenosina (Sobrevia y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2011).

1.4 Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, en forma de precursor inactivo de una sola cadena polipeptídica, la pre-proinsulina, con una secuencia señal amino-terminal que determina su incorporación a vesículas secretoras (Mounier y cols., 2006). La eliminación proteolítica de la secuencia señal y la formación de tres puentes disulfuros produce la proinsulina. Esta molécula pasa al aparato de Golgi donde es modificada y almacenada en vesículas de secreción (Shepherd, 2004). Seguido al aumento de D-glucosa en la sangre se desencadena la generación de insulina mediante la conversión de la proinsulina en insulina activa por proteasas que cortan dos enlaces peptídico para formar la molécula de insulina madura junto con cantidades equimolares de péptido C

(Nelson & Cox, 2000). La insulina es la hormona del crecimiento por excelencia durante el desarrollo fetal, promueve los depósitos de carbohidratos, lípidos y proteínas en los tejidos, así como la captación de D-glucosa por éstos. Esta hexosa es la fuente principal de obtención de energía en el feto y responde a insulina generada en el páncreas fetal desde las 12 semanas de gestación (Desoye y cols., 2007). La secreción de insulina está regulada por hormonas y señales intracelulares, como también por el sistema nervioso autónomo, e interacción de sustratos como aminoácidos y, sin duda el más importante, la D-glucosa (Shepherd, 2004). Una vez liberada desde el páncreas, insulina ejerce distintos efectos sobre sus células blanco y además regula un amplio espectro de procesos en el organismo (Muniyapa y cols., 2007).

1.4.1 Rol de la insulina en diabetes gestacional

En los estudios '*Summary and Recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus*' (Metzger & Coustan, 1998) y '*Gestational Diabetes Mellitus, Position Statement of the American Diabetes Association*' (2004), se incluye diferentes áreas prioritarias de investigación, donde se propone que la caracterización de mecanismos reguladores del flujo sanguíneo fetal, como un sector de necesaria atención. Esto se basa en la falta de información del efecto de diabetes gestacional sobre la circulación fetoplacentaria. Además, en reportes más actuales (i.e., '*Summary and Recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus*') (Metzger y cols., 2007), se incluyen diversos aspectos de la función placentaria que son recomendadas para investigaciones futuras en diabetes gestacional. Estas recomendaciones incluyen la caracterización de mecanismos de insulinoresistencia e identificaciones de mecanismos celulares que reducen la señalización

de insulina en este síndrome (Metzger y cols., 2007). Aun cuando el claro rol de insulina en diabetes gestacional es generalmente aceptado, la señalización celular y la respuesta a insulina en el tejido feto-placenta en este síndrome no es un fenómeno bien entendido (Hiden y cols., 2009; Westermeier y cols., 2009; Sobrevia & González, 2009; Sobrevia y cols., 2009; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2013). Incluso cuando los receptores de insulina son expresados en la vasculatura placentaria humana (Hiden y cols., 2009; Westermeier y cols., 2011; Salomón y cols., 2012), existe limitada información sobre la acción de este receptor sobre los efectos vasculares de insulina sobre la circulación placentaria en diabetes gestacional (Desoye & Hauguel-de Mouson, 2007; Barret y cols., 2009; Genua y cols., 2009; Sobrevia y cols., 2011).

Diabetes gestacional genera alteraciones a nivel del transporte transplacentario desde la madre al feto, un fenómeno que ocurre, entre otros factores, por la pérdida del balance hormonal que es inducido, por ejemplo, por alteraciones en la síntesis y señalización de insulina (Kuzuya & Matsuda, 1997; Metzger & Custan, 1998; Greene & Solomon, 2005; Biri y cols. 2006; Sobrevia & González, 2009; Barret y cols., 2009). Insulina genera vasodilatación dependiente de NO derivado del endotelio en sujetos normales (Steinberg & Baron, 2002; Sundell & Knuuti, 2003; Barret y cols., 2009; Sonne y cols., 2010; Timmerman y cols., 2010). Además, estudios *in vitro* muestran que insulina activa la ruta L-arginina/NO en HUVEC (González y cols. 2004, 2011a; Muñoz y cols. 2006) como en otros endotelios (Sundell & Knuuti, 2003; Barret y cols., 2009). Observaciones iniciales sugirieron un efecto vasodilatador diferencial de insulina entre la macro y microvasculatura de la placenta humana desde fetos que fueron adecuados (AGA) o grandes (LGA) para la edad gestacional en diabetes gestacional (Jo y cols., 2009). Este estudio muestra que insulina induce una vasodilatación dependiente del endotelio derivado

del NO en arterias y venas umbilicales de embarazos normales o diabetes gestacional, insulina no alteró los vasos coriónicos de embarazos normales, pero generó relajación de los vasos coriónicos de embarazos con diabetes gestacional. Estas observaciones fueron acompañadas con incrementos de insulina plasmática en sangre de cordón umbilical (Westgate y cols., 2006; Lindsay y cols., 2007; Colomiere y cols., 2009). De manera interesante, no es conocido el potencial mecanismo asociado con esta respuesta específica a insulina por la unidad feto-placentaria durante la diabetes gestacional (Youngren y cols., 2007; Barret y cols., 2009; Sobrevia & González, 2009).

1.4.2 Regulación del transporte de L-arginina vía hCAT1 por insulina

Se ha observado que en cultivos primarios de HUVEC en condiciones de euglicemia (i.e., conteniendo 5 mM de D-glucosa) y en presencia de concentraciones fisiológicas de insulina (0.1–1 nM) producen un aumento de la velocidad máxima del transporte de L-arginina (V_{\max}), pero sin cambios significativos de la K_m aparente (González y cols., 2004; 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012). Este fenómeno fue observado con una alta capacidad de transporte máximo (i.e., V_{\max}/K_m) (Casanello y cols., 2007; Vásquez y cols., 2004; Escudero y cols., 2008), lo cual indica la participación de transportadores de membrana para aminoácidos catiónicos en este proceso (González y cols., 2004; Sobrevia & González, 2009). La magnitud reportada del efecto estimulador del transporte de L-arginina (cerca de 5 veces) fue comparable al efecto de la trans-estimulación con lisina en la medición de captación de L-arginina (González y cols., 2004). Estos resultados se complementan con el aumento del número de copias de mRNA para hCAT1 (González y cols., 2004; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012) y de la abundancia de proteína (González y cols., 2011A; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012). Estos estudios

sugieren que el transporte de L-arginina es estimulado por insulina, por un aumento en la expresión de transportadores de membrana para hCAT1 en HUVEC (Sobrevia & González, 2009). Además, se ha propuesto que el efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina es un mecanismo de señalización celular, los cuales incluyen fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), proteína quinasa C (PKC) y proteínas quinasas activadas por mitógeno p42 y p44 (p42/p44^{mapk}) (González y cols., 2004), aumentando la unión del factor transcripcional Sp1 al promotor de *SCL7A1*, en la zona de consenso entre -177 a -105 pb desde el ATG (González y cols., 2011). Por otro lado, en HUVEC obtenidas desde embarazos con diabetes gestacional, muestran que en presencia de 5 mM de D-glucosa, insulina (1 nM) disminuye el transporte total de L-arginina, mientras que a 25 mM de D-glucosa, se observa una insensibilidad a insulina (0.1–10 nM) (Sobrevia y cols., 1996; 1998), lo cual abre la opción de estudiar un mecanismo de resistencia a insulina mediado por defectos a nivel del receptor de insulina o su señalización. Recientemente se ha reportado que HUVEC expresan dos subtipos de receptores de insulina, tipo A (IR-A) y B (IR-B) (Westermeier y cols., 2011), con una relación IR-A/IR-B cercano a 2, donde IR-A aumenta 1.6 veces en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, lo que sugiere la participación de estos subtipos de receptor de insulina durante la patología.

1.4.3 Receptores de insulina

Insulina genera sus efectos biológicos por la activación del receptor de insulina en la membrana plasmática de células endoteliales de venas umbilicales humanas (Zheng & Quon, 1996; Nitert y cols., 2005) y de la microvasculatura placentaria (Desoye & Hauguel-de Mouzon, 2007; Hiden y cols., 2009), un efecto que es diferencial en estos dos lechos vasculares (Hiden y cols., 2009; Sobrevia & González, 2009; Sobrevia y cols., 2011). El

gen que codifica para el receptor de insulina humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 19 y consiste de 22 exones, y 21 intrones (Seino y cols., 1989). El receptor de insulina maduro es una glicoproteína compuesta por dos subunidades β (dominio transmembrana) unida por puentes disulfuros. El N-terminal de la subunidad α extracelular (exones 1-2) y el dominio rico en cisteínas (exones 3-5) son responsables por la alta afinidad por insulina en combinación con el dominio C-terminal (residuos de aminoácidos 704-719) (Kristensen y cols., 1998; Thorsoe y cols., 2010). La señalización de insulina involucra la participación de PI3K como proteína reguladora del metabolismo de D-glucosa en tejidos como el musculo esquelético y los adipocitos promoviendo la translocación de la isoforma 4 del transportador de D-glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática y estimulando la producción de NO y la vasodilatación dependiente del endotelio. (Bergandi y cols., 2003). El efecto mitogénico es principalmente mediado por MAPK, el cual regula el crecimiento, la diferenciación, y el control, por ejemplo, de la síntesis de moléculas vasoconstrictoras como endotelina 1 (ET-1) (Kim y cols., 2006; Muniyappa y cols., 2007).

Con el clonamiento de las dos isoformas del receptor de insulina, i.e., receptor de insulina A (IR-A) y B (IR-B), se ha propuesto la posibilidad de una respuesta diferencial a insulina por una activación selectiva (o semiselectiva) de estas isoformas (Ullrich y cols., 1985; Ebina y cols., 1985; Frasca y cols., 1999; Sesti y cols., 2001; Belfiore y cols., 2009; Genua y cols., 2009; Sciacca y cols., 2003; 2010; Thorsoe y cols., 2010; Sen y cols., 2010). El cDNA de IR-A (exón 11⁻) no posee el exón 11, e IR-B (exón 11⁺) contiene el exón 11 (Genua y cols., 2009; Thorsoe y cols., 2010; Sen y cols., 2010). Ambas isoformas están expresadas en tejidos sensibles a insulina (hígado, músculo y tejido adiposo) (Moller y cols., 1989; Mosthaf y cols., 1990), pero IR-A es predominantemente expresado en el feto

y la placenta, donde juega un rol en el desarrollo embrionario (Frasca y cols., 1999). Estas isoformas están también expresadas en tejido adulto, especialmente en el cerebro (Belfiore y cols., 2009). Por otro lado, IR-B está expresado principalmente en tejido adulto diferenciado como el hígado, el cual aumenta los efectos metabólicos de insulina (Sciacca y cols., 2003, 2010; Genua y cols., 2009; Sen y cols., 2010). La desregulación del *splicing* del receptor de insulina en tejidos claves para insulina puede ocurrir en pacientes con insulinoresistencia, pero este rol en diabetes mellitus no es claro (Belfiore y cols., 2009).

Se ha reportado que en HUVEC expresan ambas isoformas del receptor de insulina (Westermeyer y cols., 2011), donde al comparar la relación IR-A/IR-B entre células normales y diabetes gestacional se observó que una diferencia de ~1.6 veces, debido a una alta expresión de IR-A en células provenientes de embarazos con diabetes gestacional. Por lo tanto, esto podría ser asociado con una disminución a la respuesta de insulina, como en otras patologías donde predomina la isoforma IR-A, como es la Diabetes Mellitus tipo 2 (Norgren y cols., 1994), y en estados de insulinoresistencia relacionados con aumento de la relación IR-A/IR-B en músculo esquelético de pacientes con distrofia miotónica tipo 1 (Savkur y cols., 2001) y 2 (Savkur y cols., 2001; Phillips y cols., 1998).

Insulina, los factores de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1) y 2 (IGF2) generan diversos efectos metabólicos y mitogénicos mediante su receptor, con actividad tirosina quinasa presente en la superficie de las células blanco. Estas hormonas poseen una alta homología estructural, ambos receptores pueden actuar como ligandos de estas moléculas. A concentraciones fisiológicas, insulina e IGF1 están unidas solo a los receptores de insulina e IGF, respectivamente. Mientras que, IGF2 se une al receptor de IGF1 (IGFR1) y a IR-A (Frasca y cols., 1999). La afinidad de IGF2 por IR-A es menor que a la de insulina para este receptor (EC_{50} 0.9 versus 2.5 nM, respectivamente), mientras que la unión de

IGF1 a IR-A es muy alta ($EC_{50} > 30nM$). La afinidad de IGF2 a IGFR1 es comparable con la de IGF1 (EC_{50} 0.6 versus 0.2 nM, respectivamente), donde insulina se une débilmente a este receptor ($EC_{50} > 30nM$) (Pandini y cols., 2002). Por lo tanto, es posible que exista una respuesta diferencial a insulina en la vasculatura fetoplacentaria dado por la activación preferencial de uno de los subtipos de receptores de insulina en embarazos con diabetes gestacional.

La expresión de las isoformas del receptor de insulina es también diferencial, IR-A se expresa preferencialmente durante la vida prenatal (incluyendo la placenta), e IR-B se expresa preferencialmente en adultos, en tejidos diferenciados (Belfiore y cols., 2009). Un desbalance en la expresión y/o prevalencia de rutas de señalización asociadas con estas isoformas puede generar serias consecuencias afectando el desarrollo normal del feto durante el embarazo (Hiden y cols., 2009; Genua y cols., 2009). Se ha reportado que el estado de insulinoresistencia está asociado con disminución de la relación IR-A/IR-B en adipocitos y músculo esquelético de sujetos con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Mosthaf y cols., 1991; Kellerer y cols., 1993; Sesti y cols., 1994), pero una alta relación de IR-A/IR-B fue descrito en músculo esquelético de pacientes con distrofia miotónica tipo 1 (Savkur y cols., 2001) y 2 (Phillips y cols., 1998; Savkur y cols., 2001), enfermedades que cursan con insulinoresistencia extrema. Aun cuando los pacientes con DMT2 tengan insulinoresistencia extrema e hiperinsulinemia, se han asociado con incremento en la expresión de la isoforma IR-A (Norgren y cols., 1994), no existe un acuerdo relativo sobre la expresión de isoformas del receptor de insulina con estas enfermedades (Belfiore y cols., 2009). Defectos en la expresión de moléculas de la señalización de insulina han sido propuestas en la placenta humana en embarazos con diabetes gestacional, sugiriendo un potencial estado de insulinoresistencia en la placenta asociado a este síndrome (Colomiere

y cols., 2009). Como los niveles de insulina fetal durante la diabetes gestacional están incrementados (Wesgate y cols., 2006; Lindsay y cols., 2007; Colomiere y cols., 2009), lo que es característico en este síndrome, no solo puede llevar a un mecanismo de crecimiento y maduración fetal, sino que también a una respuesta defectuosa dado por la señalización celular inducida por insulina en la unidad feto-placenta. Interesantemente, no se ha logrado demostrar una potencial relación entre disfunción endotelial y un desbalance en la relación IR-A/IR-B en pacientes, asociado a disfunción endotelial.

1.4.4 Regulación del efecto de insulina por adenosina

Estudios muestran que la sensibilidad a insulina en ratas suplementadas con adenosina en la dieta está aumentada (Ardiansyah y cols., 2010). Estos datos se complementan con observaciones similares descritas en adipocitos de ratas diabéticas (Joost & Steinfelder, 1982), músculo esquelético de rata no diabética (Vergauwen y cols., 1995), y pacientes con diabetes mellitus tipo 1 que recibieron una infusión de adenosina (Srinivasan y cols., 2005) (Tabla 2). En los estudios disponibles en la literatura, la concentración de adenosina, agonistas, y antagonistas de receptores de adenosina, e insulina utilizada fue superior a 100 nM, lo cual sugiere para los receptores de adenosina, que la activación e inhibición de los receptores de adenosina era completa, y para insulina, la participación tanto de IR-A e IR-B, y de los receptores de IGF en el sistema. Sin embargo, en los trabajos de Webster y colaboradores, Ciaraldi y colaboradores, Sundell y colaboradores, y Srinivasan y colaboradores, la concentración de insulina utilizada, es relativamente selectiva para los receptores de insulina, sugiriendo la posibilidad que la activación de receptores de adenosina, aumentan el efecto de insulina. De la misma manera, los trabajos de Pawelczyk y colaboradores., y Dhalla y colaboradores, muestran

Tabla 2. Regulación del efecto de insulina por agonistas/antagonistas de receptores de adenosina.

<i>Células o tejidos</i>	<i>Condición experimental</i>	<i>Efecto de insulina</i>	<i>Fenómeno biológico</i>	<i>Referencias</i>
Tejido adiposo de rata	Insulina + adenosina	Aumentado	Transporte de 2DG	Joost & Steinfelder, 1982
Músculo soleo de rata	Insulina + PIA	Aumentado	Contenido de glucógeno	Espinal y cols., 1983
Tejido adiposo de rata	Insulina + PIA	Aumentado	Transporte de 2DG	Green A. 1987
Músculo soleo de rata	Insulina + GR79236	Aumentado	Contenido de piruvato	Webster y cols., 1996
Adipocitos humanos*	Insulina + PIA	Aumentado	Transporte de 2DG	Ciaraldi y cols., 1997
Músculo soleo de rata	Insulina + DPCPX	Aumentado	Transporte de 2DG	Han y cols., 1998
Músculo esquelético de rata	Insulina + DPCPX	Aumentado	Transporte de 2DG	Derave & Hespel. 1999
Venas coronarias	Insulina + adenosina	Aumentado	Flujo sanguíneo	Laine y cols., 2000; 2004
Venas coronarias	Insulina + adenosina	Aumentado	Flujo sanguíneo	Sundell y cols., 2002
Venas coronarias [†]	Insulina + adenosina	Aumentado	Flujo sanguíneo	Srinivasan y cols., 2005
Músculo esquelético de rata	Insulina + cafeína	Disminuido	Transporte de 2DG	Vergauwen y cols., 1994
Linfocitos T humano	Insulina + ZM-241385	Disminuido	Proliferación celular	Pawelczyk y cols., 2005
Adipocitos de rata	Insulina + CVT-3619	Disminuido	Secreción ácidos grasos	Dhalla y cols., 2008
Músculo esquelético de rata	Insulina + cafeína	Disminuido	Transporte de 2DG	Kolnes y cols., 2010
HUVEC	Insulina+ZM-241385	Disminuido	Transporte de L-arginina	Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012

Tabla 2 continúa en la página 26

PIA: N⁶-(fenilisopropil) adenosina, GR79236: N-[(1S,trans)-2-hidroxiciclopentil] adenosina, DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina, ZM-241385: 4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol, CVT-3619: N⁶-[2-{6-[(1R,2R)-2-hidroxiciclopentil]-amino}purín-9-yl}(4S,5S,2R,3R)-5-[(2-fluorofeniltio)metil]-oxolano-3,4-diol-adenosina, 2DG: 2-deoxi-D-glucosa, *muestras obtenidas de pacientes con síndrome de ovario poliquístico, †muestras de pacientes con diabetes mellitus tipo 1.

que la inhibición de receptores de adenosina, bloquean el efecto de insulina, mediado sólo por los subtipos de receptores de insulina. Además, la expresión y activación de receptores de adenosina reduce los niveles plasmáticos de D-glucosa, por medio de un incremento en la liberación y del efecto biológico de insulina en ratas diabéticas (Johansson y cols., 2006; Németh y cols., 2007; Töpfer y cols., 2008).

La activación del receptor de adenosina A_1 (Vergauwen y cols., 1994) o la disminución de la expresión del receptor de adenosina A_{2B} (Ardiansyah y cols., 2010, Figler y cols., 2011), resultan en un aumento de la sensibilidad a insulina, pero no existe información sobre los mecanismos específicos que expliquen la acción biológica de adenosina (Burnstock y cols., 2006; San Martín & Sobrevia, 2006; Mundell & Kelly, 2010). La activación del receptor de adenosina A_{2B} , pero en menor grado que los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , previenen el desarrollo de diabetes en ratón (Németh y Cols., 2007). Pero, en un estudio reciente muestra que la sensibilidad a insulina disminuye en ratones C57BL/6J al activar farmacológicamente el receptor A_{2B} , a excepción del ratón *knock-out* para este receptor, sugiriendo que el receptor de adenosina A_{2B} participa en el proceso de insulinoresistencia (Figler y cols., 2011). Esto abre la posibilidad de que el aumento y/o la inhibición de la expresión, o de la actividad de los receptores de adenosina puedan asociarse como un mecanismo de protección contra este síndrome. Basado en estos antecedentes existiría una posible comunicación cruzada entre los receptores de adenosina y los receptores de insulina, un fenómeno que podría generar un potencial mecanismo regulatorio de las acciones biológicas de insulina en la vasculatura fetoplacentaria en diabetes gestacional.

1.5 Comentario Final

Diabetes gestacional causa alteración de la función endotelial de la macro y microcirculación fetoplacentaria asociada con aumento en la síntesis de NO así como del transporte de L-arginina mediado por hCAT-1. La presencia de altos niveles de insulina y de adenosina en la sangre umbilical en diabetes gestacional, sugieren la participación de estas moléculas en la etiología de este síndrome. La activación de receptores de adenosina del tipo A_{2A} y los receptores de insulina aumentan la expresión y actividad de hCAT-1 y eNOS en HUVEC de embarazos normales, mientras que en células provenientes de embarazos con diabetes gestacional la activación de estos receptores de adenosina sería parte del mecanismo que explicaría un aumento anormal de la síntesis de NO en HUVEC. Por otra parte, se ha propuesto que insulina actuaría como un factor que revierte el aumento del transporte de L-arginina y la síntesis de NO en células de diabetes gestacional a valores observados en células de embarazos normales. La dualidad del efecto de insulina puede ser explicada por la diferencia en la expresión de receptores de insulina (IR-A e IR-B) en embarazos normales o con diabetes gestacional. Se ha descrito que los efectos de insulina dependen de la actividad de receptores de adenosina en otros modelos celulares, sugiriendo la posibilidad de que este nucleósido actúe como regulador de la expresión y/o actividad de los receptores de insulina. Así, si en diabetes gestacional aumenta la expresión y actividad de hCAT-1 las interrogantes centrales que se plantean en esta tesis incluyen el ¿cómo puede insulina disminuir la expresión y actividad de hCAT-1? y el si ¿adenosina puede regular la expresión asociada a la activación de receptores de insulina? Contestar estas preguntas nos permitiría comprender los mecanismos de insulina (Figura 2), abriendo la posibilidad de estudiar potenciales tratamientos para esta patología.

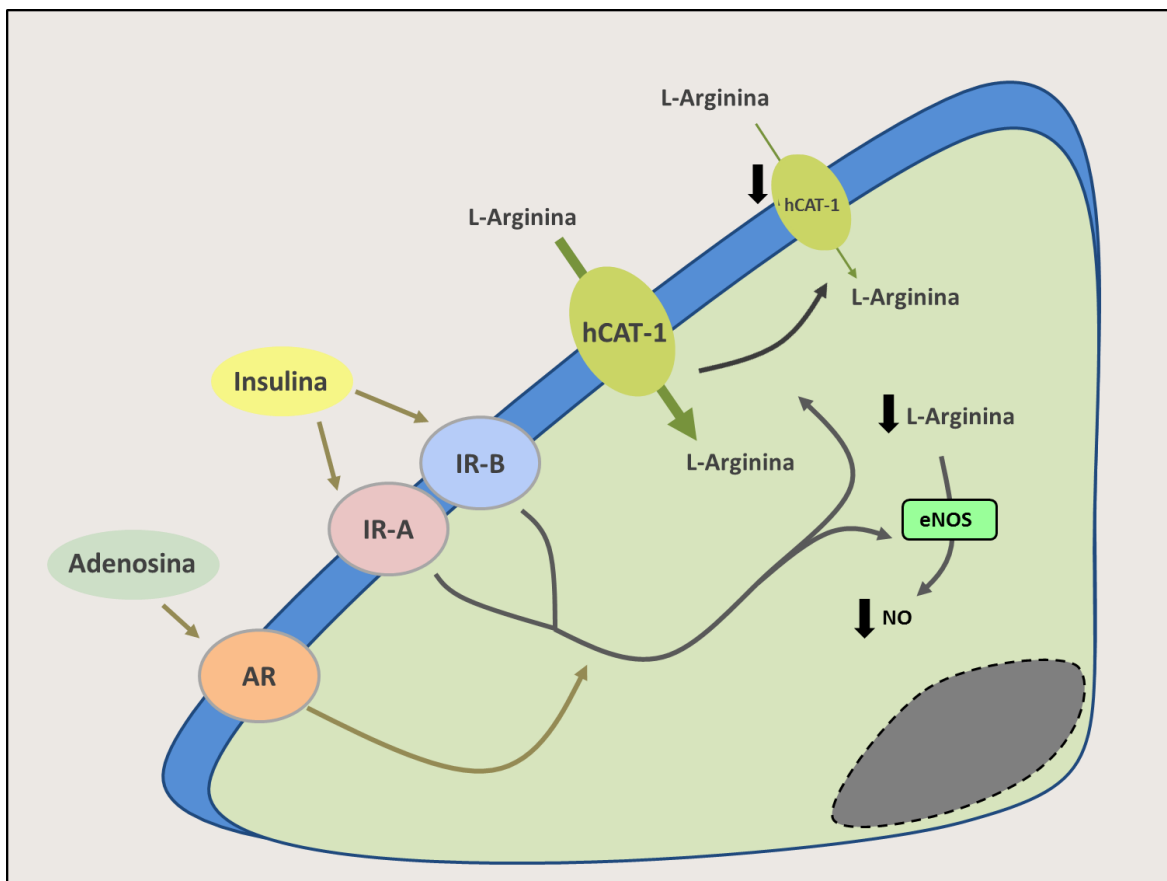


Figura 2. Modulación del transporte de L-arginina vía hCAT-1 por insulina y adenosina en HUVEC de embarazos con diabetes gestacional. Insulina activa los receptores de insulina tipo A (IR-A) y B (IR-B), llevando a una disminución del aumento del transporte de L-arginina vía hCAT-1 y la síntesis de óxido nítrico (NO) causado por diabetes gestacional. Este efecto podría ser regulado por la activación de receptores de adenosina (AR), aumentando el transporte de L-arginina vía hCAT-1 hasta aquellos valores observados en células de diabetes gestacional.

2. Hipótesis

El aumento de la expresión y actividad de hCAT-1 causado por diabetes gestacional es bloqueado por insulina mediante la activación diferencial de receptores de insulina A y B, un fenómeno que depende de la activación de receptores de adenosina, en células endoteliales de vena umbilical humana.

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

1. Determinar si insulina disminuye la actividad y expresión de hCAT-1 mediante activación diferencial de IR-A y/o IR-B en diabetes gestacional.
2. Determinar si la disminución de la actividad y expresión de hCAT-1 causada por insulina involucra la participación de receptores de adenosina en diabetes gestacional.

3.2 Objetivos específicos

Para objetivo general 1

1. Determinar el efecto de la estimulación de IR-A y/o IR-B por insulina sobre los parámetros cinéticos del transporte de L-arginina (V_{max} , K_m , K_D) vía hCAT-1.
2. Determinar el efecto de la estimulación de IR-A y/o IR-B por insulina en la expresión de mRNA y la abundancia de la proteína hCAT-1
3. Determinar el efecto de la estimulación de IR-A y/o IR-B por insulina sobre la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*.

Para objetivo general 2

1. Determinar el tipo(s) de receptor de adenosina involucrado en los cambios causados por insulina por la estimulación de IR-A y/o IR-B en los parámetros cinéticos de transporte de L-arginina vía hCAT-1.
2. Determinar el tipo(s) de receptor de adenosina involucrado en los cambios causados por insulina por la estimulación de IR-A y/o IR-B en la expresión de mRNA y la abundancia de la proteína hCAT-1.
3. Determinar el tipo(s) de receptor de adenosina involucrado en los cambios causados por insulina por la estimulación de IR-A y/o IR-B en la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*.

4. Métodos

4.1 Muestras biológicas y cultivo celular

4.1.1 Colección de cordones umbilicales

Este estudio incluyó pacientes atendidas en el sistema de salud de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se recolectaron los cordones umbilicales de fetos provenientes de pacientes con embarazos normales y de pacientes con diagnóstico de diabetes gestacional, con feto único y edad gestacional ≥ 37 semanas. Durante el control prenatal, las embarazadas fueron evaluadas mediante una prueba de sobrecarga oral a la D-glucosa (75 gramos en ayuno) entre las 26 y 28 semanas. Las embarazadas con glicemia de ayuno >90 mg/dl y >140 mg/dl post carga (2 horas) serán diagnosticadas como pacientes con diabetes gestacional y manejadas clínicamente con un régimen de 200 gr de hidratos de carbono al día. Los criterios de inclusión y exclusión para las muestras de cordones umbilicales provenientes de embarazos con diabetes gestacional se muestran en la Tabla 3. Los criterios de inclusión para las muestras de cordones de embarazos normales son idénticos a los requeridos para diabetes gestacional exceptuando este último diagnóstico.

Los cordones umbilicales fueron recolectados al momento del parto y fueron trasladados en solución de tampón fosfato salino (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7.8 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) refrigerado (2-8°C) y estéril hasta el laboratorio. Se obtuvieron los consentimientos informados de cada paciente participante de este estudio (ver Carta de Consentimiento en Anexo 1), documento aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Estas muestras biológicas serán utilizadas sólo para los objetivos indicados en el presente proyecto y en las publicaciones de los resultados de estos estudios no se incluirá los nombres ni información personal de las pacientes y de los recién nacidos.

Tabla 3. Criterios de selección de muestras biológicas.

<i>Inclusión</i>	<i>Exclusión</i>
Diabetes mellitus gestacional (DMG)	Tratamiento con insulina
Feto único	Pre-eclampsia
Edad gestacional ≥ 37 semanas	Síndrome hipertensivo del embarazo
	Retardo de crecimiento intrauterino
	Corioamnionitis clínica
	Colestasia intrahepática del embarazo
	Isoinmunización Rh o D
	Presencia de meconio en el líquido amniótico
	Diabetes mellitus pre-gestacional
	Obesidad
	Patología crónica

4.1.2 Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana

Las células endoteliales fueron obtenidas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) de embarazos normales. Para aislar y cultivar las HUVEC se utilizó el método descrito inicialmente por Jaffe y cols. (1973) adaptado en el laboratorio (González y cols., 2011). Este procedimiento consiste en canular la vena umbilical, repletar el lumen venoso con solución de colagenasa tipo II (*Clostridium histolyticum*, 0.2 mg/ml) preparado en medio 199 (M199). Las venas umbilicales fueron incubadas por 15 minutos a 37°C. Luego de completado el período de digestión con colagenasa, la suspensión celular fue centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos y el pellet resultante fue resuspendido en M199 suplementado con 3.2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina/streptomycin, 10% de suero bovino fetal y 10% de suero de recién nacido (medio de cultivo primario, PCM). La suspensión celular fue transferida a placas de cultivo celular cuya superficie (60 mm²) fue cubierta con gelatina al 1%. Las células fueron mantenidas en un ambiente humidificado a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ equilibrado con aire. El PCM fue reemplazado completamente cada 48 horas hasta lograr 100% de confluencia (i.e., monocapa endotelial).

4.1.3 Condiciones experimentales

Una vez que las células en pasaje 1 alcanzaron 100% de confluencia (monocapa) fueron traspasadas a placas de experimentación (pasaje 2). Al alcanzar ~90% de confluencia fueron deprivadas de suero pre-incubándolas por 12 horas en M199. Luego, las células fueron expuestas a insulina (1 nM, 8 horas), NECA (N-etilcarboxamidoadenosina; agonista inespecífico de receptores de adenosina, 1000 nM), CPA (N-ciclopentiladenosina; agonista específico para receptores de adenosina tipo A₁, 30 nM), CGS-21680 (3-[4-[2-[[6-

amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbamoil)-3,4-dihidroxi-oxolan-2-il]purin-2-il]amino]etil]fenil]ácido propanoico; agonista específico para receptores de adenosina tipo A_{2A}, 30 nM), 2Cl-IB-MECA (1-[2-Cloro-6-[(3-iodofenil)metil]amino]-9H-purin-9-il]-1-deoxi-N-metil-β-D-ribofuranuronamido; agonista específico para receptores de adenosina tipo A₃, 30 nM), DPCPX (8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina; antagonista selectivo para receptores de adenosina tipo A₁, 30 nM), ZM-241385 (4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol; antagonista específico para receptores de adenosina tipo A_{2A}, 10 nM), MRS-1754 ([N-(4-cianofenil)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahidro-2,6-dioxo-1,3-dipropil-1H-purin-8-il)-fenoxi]acetamida; antagonista selectivo para receptores de adenosina tipo A_{2B}, 30 nM) y/o MRS-1523 (3-propil-6-etil-5-[(etil-tio)carbonil]-2-fenil-4-propil-3-piridina carboxilato; antagonista para receptores de adenosina tipo A₃, 30 nM).

Para evaluar la activación diferencial de IR-A e IR-B, cultivos primarios de HUVEC fueron infectados con un vector adenoviral que contenía *siRNA* dirigido a cada receptor para generar células *knockdown* para IR-A o IR-B (ver sección Transducción adenoviral de HUVEC). A las 40 horas post-infección las células serán expuestas a insulina a las diferentes condiciones antes mencionadas.

4.1.4 Cuantificación de proteínas

La metodología utilizada fue el método de Bradford (Bradford, 1976) fundamentado en el cambio de coloración del azul brillante de Coomassie ante diferentes concentraciones de proteína. La solución comercial de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) será diluida 1/5 (v/v) y sus alícuotas de 100 μl fueron transferidas a placas de 96 pocillos. En función del tipo y estado de confluencia celular, fueron añadidos 5, 10 ó 20 μl de muestra de lisado proteico homogenizados por agitación. Adicionalmente, se preparó una

curva estándar con BSA conteniendo 0, 20, 30, 50, 80 y 100 ng/ml. A partir de esta curva estándar los valores fueron interpolados con las absorbancias medidas a 595 nm de longitud de onda para cada muestra en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Thermo LabSystems).

4.2 Transporte de L-arginina

Monocapas confluentes de células endoteliales en pasaje 2 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos siendo usadas para realizar estos experimentos como se ha descrito (González y cols., 2011). El medio de cultivo fue removido y las células serán lavadas (x2) con 200 μ l por pocillo de solución Krebs (131 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM D-glucosa, 20 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4). Las células fueron expuestas a L-arginina 300 μ M para ensayos de captación y de 15 a 1000 μ M para ensayos de transporte en mezcla con L-[³H]arginina (3 μ Ci/ml) por 1 minuto (velocidad inicial) a 37°C en solución Krebs. Los ensayos fueron realizados en presencia de D-[¹⁴C]manitol (0.05-0.4 μ Ci/ml) como marcador extracelular. La captación de L-arginina fue detenida removiendo el medio de captación y lavando (x2) con solución Krebs a 4°C (Sobrevia y cols., 1995). Una vez finalizado los experimentos de transporte, las células fueron digeridas con 1 N de ácido fórmico para realizar la determinación de proteínas. El digerido de células fue traspasado a tubos de plástico y mezclados con líquido de centelleo (2 ml) y etanol (96%, 3 ml).

Los parámetros cinéticos del transporte de L-arginina (constante aparente de Michaelis-Menten y velocidad máxima, K_m y V_{max} , respectivamente) fueron determinados usando concentraciones crecientes de L-arginina no marcada con tritio. Los cálculos para el transporte mediado de L-arginina fueron realizados de acuerdo a la siguiente fórmula:

Componente saturable = (captación total) – (componente no saturable) (Ecuación 1)

En la cual, la captación total (CT) fue definida por:

$$CT = \frac{V_{max} \bullet [Arg]}{K_m + [Arg]} + (m \bullet [Arg]) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde [Arg] fue la concentración de L-arginina en el medio y ($m \bullet [Arg]$) fue el componente no saturable (lineal) del transporte en el rango de concentraciones a usar en este estudio.

A partir de la representación gráfica de los datos de transporte total se calculó el valor de la pendiente de la fase lineal correspondiente al componente no saturable de transporte (m). Al restar el componente no saturable del transporte total, se obtuvieron los datos de transporte saturable los cuales fueron representados por la ecuación de Michaelis-Menten sin el componente saturable:

$$V = \frac{(V_{max} \bullet [Arg])}{(K_m + [Arg])} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde v corresponde a la velocidad inicial del transporte a diferentes concentraciones de L-arginina. El parámetro cinético V_{max} será expresado como pmol/ μ g proteína/minuto y la K_m aparente como μ M. La capacidad de transporte de L-arginina fue estimada por la razón V_{max}/K_m (Devés y Boyd, 1998; Mann y cols., 2003).

La contribución relativa al transporte saturable de L-arginina de cada condición experimental comparada con la condición control, en células normales y con diabetes

gestacional, fue estimada a partir de los valores de V_{\max}/K_m de L-arginina (Escudero y Sobrevia, 2008) mediante la siguiente expresión:

$${}^{C/X}F = \frac{{}^C V_{\max} \bullet {}^X K_m}{{}^C K_m \bullet {}^X V_{\max}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde ${}^C V_{\max}$ y ${}^C K_m$ fueron los parámetros cinéticos para el transporte de L-arginina en células normales o con diabetes gestacional en ausencia de insulina y/o agonistas/antagonistas de receptores de adenosina, i.e., control (C), ${}^X V_{\max}$ y ${}^X K_m$ fueron los parámetros cinéticos para el transporte de L-arginina en presencia de insulina y/o agonistas/antagonistas de receptores de adenosina (X).

La contribución relativa de CPA, CGS-21680, NECA, 2Cl-IB-MECA, DPCPX, ZM-241385, MRS1754 y/o MRS1523 al efecto de insulina sobre al transporte saturable de L-arginina, fue estimada mediante:

$${}^{Ins/X}F = \frac{{}^C V_{\max} \bullet {}^X K_m}{{}^C K_m \bullet {}^X V_{\max}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde ${}^{Ins} V_{\max}$ e ${}^{Ins} K_m$ fueron los parámetros cinéticos para el transporte de L-arginina en presencia de insulina, ${}^X V_{\max}$ y ${}^X K_m$ fueron los parámetros cinéticos para el transporte de L-arginina en presencia de insulina y NECA, CPA, CGS-21680, 2Cl-IB-MECA, DPCPX, ZM-241385, MRS1754 y/o MRS1523.

4.3 Expresión de hCAT-1 y receptores de insulina

4.3.1 Western blots

Células confluentes en pasaje 2 cultivadas en M199 sin sueros fueron lavadas (2x) con PBS (200 μ l por pocillo, 37°C) y preincubadas en solución Krebs en ausencia o en presencia de insulina y/o NECA, CPA, CGS-21680, 2Cl-IB-MECA, DPCPX, ZM-241385, MRS1754 o MRS1523. La reacción fue detenida lavando las células con PBS frío conteniendo ortovanadato de sodio (200 mM). Las células fueron lisadas en buffer de lisis [63.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 10% glicerol, 2% SDS, 1 mM ortovanadato de sodio, 1 mM 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro (AEBSF), 50 mg/ml leupitina, 5% 2-mercaptoetanol]. Los lisados proteicos (70 μ g) fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas fueron bloqueadas por 12 horas en albúmina de suero de bovino al 5% en solución salina Tris Tween (TBST) (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.02% v/v Tween 20, 4°C, pH 7.4) y probadas con anticuerpo primario *anti*-hCAT-1 (dilución 1/500), *anti*-Sp1 (dilución 1/500), y *anti*- β -actina (dilución 1/5000) (González y cols., 2011, Westermeier y cols., 2011). Las membranas fueron lavadas (x6) en TBST e incubadas por 1 hora en 0.2% TBST/BSA conteniendo anticuerpo *anti*-IgG de conejo conjugado con HRP (dilución 1/3000 en 0.2% TBST/BSA). Las bandas de proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia aumentada.

4.3.2 Extracción de RNA total y transcripción reversa

El RNA total fue aislado utilizando isotiocianato de guanidina/fenol (Chomczynski/Fenol). El RNA fue cuantificado por espectrofotometría (A_{260} nm) y su integridad fue evaluada por la relación A_{260}/A_{280} y la visualización en gel de agarosa (2%).

Para la reacción de transcripción reversa se utilizaron alícuotas de 1 µg de RNA total, usando oligo(dT)₁₈, partidores aleatorios (random primers) y la enzima MMLV-RT (Molones Murine Leukaemia Virus-Reverse Transcriptase, Promega) (González y cols., 2011; Westermeier y cols., 2011).

4.3.3 PCR no cuantitativo

Los cDNA fueron amplificados utilizando los partidores (0.5 µM) descritos en la Tabla 4 en mezcla (20 µl) con dNTPs (0.2 mM de cada uno), Taq DNA polimerasa (2.5 UI/l), MgCl₂ (2 mM) y 5 ó 10% del producto de transcripción reversa como templado (volumen final de 20 µl) (González y cols., 2004; 2011). En todos los ensayos se realizó un ciclo de incubación a 95°C por 5-7 minutos, 30-40 ciclos que incluyen un paso de denaturación por 30 segundos a 95°C, alineamiento por 56°C (IR-A e IR-B), 57°C (hCAT-1) o 54°C (18S), y una extensión a 72°C por 5-7 minutos. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador modelo I-Cycler de BioRad.

Los productos obtenidos luego de la reacción de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa (1-2%) en solución tampón Tris-borato-EDTA, conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Los productos de amplificación fueron observados por medio de la exposición del gel a luz UV en un transiluminador y la imagen fue capturada mediante una cámara NIKON (USA). Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas mediante el programa Scion Image Beta 4.02 (Scion Corporation, USA). Los resultados fueron expuestos como la razón entre cada una de las muestras y su correspondiente control interno (18S).

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para PCR no cuantitativo y cuantitativo

Partidor	Secuencia
hCAT-1 sentido	5'-GAGTTAGATCCAGCAGACCA-3'
hCAT-1 antisentido	5'-TG TTCACAATTAGCCCAGAG-3'
18S sentido	5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3'
18S antisentido	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'
28S sentido	5'-TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3'
28S antisentido	5'-ACATTGTTCCAACATGCCAG-3'

hCAT-1, Transportador de aminoácidos catiónicos tipo 1; 18S, subunidad ribosomal 18S; 28S, subunidad ribosomal 28S.

4.3.4 PCR cuantitativo (real time)

Los ensayos de PCR cuantitativo serán realizados por PCR de tiempo real utilizando un sistema termociclador rápido LightCycler™ (Roche Diagnostics, Lewes, U.K.) (González y cols., 2004; 2011; Westermeier y cols., 2011). La reacción será realizada en un volumen de 10 µl utilizando los partidores (0.5 µM) descritos en la Tabla 4 en mezcla con dNTPs (0.2 mM de cada uno), Taq DNA polimerasa (2.5 UI/l) y solución tampón de reacción entregada en la mezcla QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN, Crawley, U.K.). Todos los ensayos incluirán un paso de denaturación a 95°C por 15 segundos, seguido por 20 segundos de alineamiento a 56°C (IR-A e IR-B), 54°C (hCAT-1), ó 52°C (28S) y una extensión final a 72°C por tiempos variables dependiendo del tamaño del producto (10-30 segundos).

La detección del producto fluorescente fue realizada al final de cada ciclo luego de un paso adicional de 3 segundos a 3°C bajo la temperatura de ‘melting’ del producto (*T_m*). La especificidad de los productos fueron confirmadas por electroforesis en gel de agarosa (1.5 % v/v) y por el análisis de las curvas de melting (González y cols., 2004; 2011; Westermeier y cols., 2011).

Para preparar los estándares para el PCR tiempo real, los productos de hCAT-1, IR-A, IR-B y 28S fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (1.8% v/v) y visualizados por tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Los productos fueron secuenciados utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y el secuenciador automático de DNA ABI Prism 3730 (Applied Biosystems/Hitachi). Cada producto fue removido desde el gel, purificado por centrifugación en columnas usando el kit de extracción desde gel Qiaquick (Qiagen, Crawley, U.K.) y cuantificado por densitometría utilizando como referencia el marcador de

peso molecular *HpaII* digerido de pBluescript II 1 (SK+). Los estándares fueron preparados por diluciones seriadas de cada producto de PCR en tRNA para obtener concentraciones desde 10^1 a 10^9 copias por cada 2 μ l. La expresión génica fue cuantificada usando una muestra de 2 μ l de cDNA de HUVEC diluido 10 veces. Todos los ensayos incluyeron blancos de tRNA o de RNA de HUVEC además de las muestras de cDNA de HUVEC y los estándares.

4.4 Promotor *SLC7A1* y *knockdown* de receptores de insulina

4.4.1 Clonamiento de una región del promotor de *SLC7A1*

El constructo de la región promotora de *SLC7A1* se encuentra disponible en el laboratorio (González y cols., 2011). Brevemente, a partir del DNA genómico proveniente de células HUVEC la región promotora (i.e., región río arriba del inicio de la transcripción) de *SLC7A1*, fue clonado en el vector reportero pGL3 (Promega) dejando acoplado el gen reportero luciferasa a un segmento de DNA correspondiente a un fragmento del promotor del gen de interés para estudiar su actividad transcripcional (González y cols., 2011a). Luego, dos regiones del promotor fueron amplificadas las cuales abarcan +142 pb del exón 1 hasta -650 pb y -1606 pb río arriba del inicio de la transcripción, respectivamente. Posteriormente fueron clonados en el sistema plasmidial pCR®-Blunt II-TOPO®. Cada reacción de ligación fue introducida en bacterias competentes mediante el proceso de transformación. Posteriormente, aquellos clones conteniendo el vector plasmidial fueron seleccionados y purificados. Los fragmentos de DNA del promotor fueron liberados desde el vector de clonamiento utilizando las enzimas de restricción *MluI* y *NcoI*. La digestión de los plásmidos entregó los productos esperados de 1748 y 792 pb, además del vector vacío. Este mismo protocolo fue realizado para

linealizar el vector pGL3-Basic. Los productos de digestión correspondientes al promotor de *SLC7A1* fueron aislados desde el gel de agarosa y subclonados individualmente mediante reacción de ligación en el vector pGL3-Basic linealizado, río arriba del gen luciferasa *firefly*. Los vectores reporteros así construidos (pGL3-hCAT1⁻⁶⁵⁰ y pGL3-hCAT1⁻¹⁶⁰⁶) fueron comprobados por digestión enzimática y secuenciación (González y cols., 2011a).

4.4.2 Transfección transitoria y medición de la actividad de luciferasa

La medición de la expresión de los genes reporteros luciferasa *firefly* (bajo el control del promotor de *SLC7A1*) y luciferasa *renilla* (bajo el control del promotor de Timidina Quinasa [TK] del virus *Herpes simplex*) fueron realizados en una alícuota de un mismo lisado de células co-transfectadas con ambos plásmidos (pGL3-hCAT1 y pRL-TK). Luego de 48 horas de transfectar por electroporación (300 V, 700 μ F, 5-6 milisegundos) (Farías y cols., 2010; González y cols., 2011a; Westermeier y cols., 2011) la actividad de los genes reporteros fue medida por luminosidad de luciferasas *renilla* y *firefly*, usando sustratos específicos para cada una de estas enzimas (*Dual-luciferase*TM *Reporter Assay System*, Promega). La actividad transcripcional de cada construcción del promotor de *SLC7A1* fue determinada mediante la relación entre la actividad de luciferasa *firefly* y la actividad luciferasa *renilla*, razón denominada actividad luciferasa relativa, lo que permitió controlar el efecto de la eficiencia de la transfección. Para esto, se eliminó del medio de cultivo las células transfectadas, las cuales fueron entonces lavadas con 1 ml de PBS frío (x2) y finalmente lisadas mediante la adición de 100 μ l de una solución de lisis (*Passive Lysis Buffer*, Promega) y agitación fuerte por 15 minutos (100-150 rpm, temperatura ambiente). El lisado celular fue transferido a un tubo de experimentación y mantenido en

hielo o a -20°C hasta el ensayo. Cada ensayo fue realizado en duplicado con $6\ \mu\text{l}$ de lisado celular y $15\ \mu\text{l}$ de cada sustrato (para luciferasa *renilla* y *firefly*). Las lecturas fueron realizadas en un luminómetro (Sirius, Berthold Detection System) registrándose las unidades relativas de luminiscencia (URL) luego de 5 segundos de medición (Farías y cols., 2010; González y cols., 2011; Westermeier y cols., 2011).

4.4.3 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Cultivos primarios de HUVEC fueron fijados en 1% de paraformaldehído (PFA, 10 min, 22°C) con el objetivo de estabilizar los nucleosomas mediante entrecruzamiento reversible entre las proteínas nucleares y el DNA, para proceder con el protocolo de ChIP como ha sido descrito (Farías y cols., 2010; González y cols., 2011). Luego se eliminó el PFA y se detuvo la reacción con 1 ml de solución $125\ \mu\text{M}$ de glicina en PBS (5 min, 22°C) y dos lavados adicionales con PBS (5 min, 22°C). Se agregó 1 ml de PBS y las células fueron recolectadas por arrastre, transferidas a un tubo de experimentación y centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C . El *pellet* celular fue resuspendido en buffer de lisis celular (5 mM HEPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% Tritón X-100), incubando (20 min, 4°C) y centrifugando posteriormente (3000 rpm, 3 min, 4°C). Luego, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en buffer de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) conteniendo inhibidores de proteasas (1 μM leupetina, 1 μM pepstanina A, 200 μM PMSF), incubado por 20 minutos a 4°C . La suspensión de núcleos lisados fue sometido a sonicación (80%, 30 pulsos de 10 segundos, 4°C , *Micro Ultrasonic Cell Disrupter*, KONTES) para fragmentar la cromatina y los desechos celulares fueron removidos por centrifugación (14000 rpm, 20 min, 4°C). La efectividad de la fragmentación de cromatina fue evaluada por visualización de una alícuota de

sobrenadante en un gel de agarosa al 1%, siendo lo óptimo la obtención de fragmentos de ~500-1000 pb. Una alícuota adicional del sobrenadante se guardó a 4°C para usarla como control (*Input*).

El resto del sobrenadante de la etapa anterior fue incubado en agitación suave (1 hora, 4°C) con esferas de proteína G-agarosa previamente lavadas (10 min, 4°C, por 3 veces) con 1 ml de *buffer de dilución* ChIP (0.01% SDS, 1.1% Tritón X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl, y la mezcla de inhibidores de proteasas) e incubadas (4°C, 12 horas) con 20 µl de DNA de espermio de salmón (ssDNA, 10 mg/ml). Luego se incubaron con 100 µl de esta reacción (cromatina pre-clareada) con 2 µg de anticuerpo primario correspondiente al ensayo a realizar (*anti-Sp1*, *anti-NFκB*) y los inmunocomplejos fueron separados con esferas de proteína G-agarosa pretratadas con BSA 3% y ssDNA. Las esferas fueron recolectadas por centrifugación y lavadas secuencialmente con las siguientes soluciones: (1) buffer con bajo contenido de sales (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM de EDTA, 20 mM Tris-HCl pH8.0 y 150 mM NaCl), (2) Buffer con alto contenido de sales (0.1% SDS, 1% de Tritón X-100, 2 mM de EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 500 mM de NaCl), (3) buffer con LiCl (0.25 mM LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% de deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl pH 8.0), y (4) buffer TE (1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl). El complejo inmunoprecipitado fue eluído con 150 µl de una solución de 1% SDS y 0.1 mM de NaHCO₃, incubando por 15 minutos a 22°C, y posteriormente centrifugando a máxima velocidad (3000 rpm, 2 min, 22°C). Para revertir el entrecruzamiento del paraformaldehído se incubaron las muestras a 65°C por 14 horas (overnight) en 330 mM NaCl seguido por una precipitación con una solución de isopropanol/glicógeno. Las muestras fueron incubadas (1 hora, 65°C) en un buffer de pteinasa K (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM EDTA, 1.25% SDS, 10 µg

proteínasa K) y el DNA fue purificado usando una solución fenol/cloroformo (1:1 v/v), precipitado con isopropanol/glicógeno y luego tratada con RNAsa A (10 µg/ml, 1 hora, 37°C). Alícuotas de 1 µl (dilución 1:10) de DNA (*Input* y precipitado) fueron usados para los ensayos de PCR. Las condiciones para la amplificación (30 ciclos) fue 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Los partidores para la zona de consenso del promotor entre -177 a +105 desde el inicio de la transcripción de *SCL7A1* son: promotor hCAT-1 sentido 5'-ATTGGTGCCCGGTGA-3' y promotor hCAT-1 antisentido 5'-GGTTCCGGCGCCAGGTTTCAT-3' (producto esperado de 249 pb) (González y cols., 2011a).

4.4.4 Silenciamiento génico de IR-A e IR-B

En este estudio se utilizó el sistema adenoviral comercial pSilencer Adeno 1.0-CMV System (Ambion, USA) para la generación de secuencias de siRNA para IR-A e IR-B, incorporadas en vectores adenovirales generando adenovirus portador de siRNA contra IR-A (Ad-siIR-A), IR-B (Ad-siIR-B) (Farías y cols, 2006; Salomón y cols., 2012).

4.4.5 Generación de los plásmidos pShuttle-siIR-A y B

Se han diseñado un set de oligonucleótidos complementarios (siIR-A-S: 5'-TCGAGCGTCCCCAGAAAAACCTCTTTCAAGAGAAGAGGTTTTTCTGGGGACGAA-3', siIR-A-AS: 5'-CTAGTTTCGTCCCCAGAAAAACCTCTTCTCTTGAAAGAGGTTTTTCTGGGGACGC-3', siIR-B-S: 5'-TCGAGTTCGTCCCCAGGCCATCTCTTCAAGAGAGATGGCCTGGGGACGAAAAA-3', siIR-B-AS: 5'-CTAGTTTTTCGTCCCCAGGCCATCTCTCTTGAAGAGATGGCCTGGGGACGAAC-3') en el laboratorio que codifican para una secuencia de RNA con estructura de horquilla (siRNA

hairpin) dirigida contra el mRNA de los receptores de insulina (IR-A o IR-B) humana. La secuencia blanco en el mRNA del receptor de insulina fue seleccionada según los criterios descritos en la página www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html. Como estrategia para clonar estos oligonucleótidos en el vector pShuttle1.0-CMV, éstos fueron sintetizados cuidando que al hibridar se genere la secuencia teórica que resultaría de la digestión enzimática con *XhoI* y *SpeI*. Estos oligonucleótidos fueron alineados y clonados en el vector pShuttle mediante reacción de ligación, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de ligación fue amplificado por transformación de bacterias JM-109 competentes y los clones transformantes portadores del constructo plasmidial pShuttle-eNOS siIR-A o siIR-B fueron confirmados por restricción enzimática y secuenciación (Salomón y cols., 2012).

Para controlar el efecto de la infección adenoviral se utilizó el vector pShuttle de control negativo [pShuttle-Control (-)]. Éste corresponde a un vector pShuttle recombinante provisto en el kit comercial, cuya secuencia insertada en el sitio de multiclonamiento corresponde a una secuencia de siRNA “azarosa” (scramble) con un efecto nulo en células humanas y murinas. Este vector se utilizó para la generación del adenovirus control negativo [Ad-Control(-)].

4.4.6 Recombinación homóloga en células HEK293

La recombinación homóloga se llevó a cabo en células HEK293 según las indicaciones del fabricante (Ambion). Alícuotas (15 µg) de los plásmidos pShuttle-siIR-A y IRB, pShuttle-Control (-) y el esqueleto adenoviral LacZ (4 µg) fueron linearizados mediante digestión con la enzima de restricción *PacI*. Los productos de digestión fueron transfectados en células HEK293 (placas de 60 mm de diámetro, 60% de confluencia)

mediante la técnica de fosfato cálcico. Para esto, las células fueron incubadas (4 horas) con una mezcla de ambas reacciones de restricción en presencia del tampón salino HEPES (HBS, del inglés *HEPES buffered saline*) y 125 mM CaCl₂. Los complejos formados entre el DNA y el fosfato cálcico precipitan sobre las células y permiten la entrada de los vectores linearizados. Luego de un cambio de medio que extrae el exceso de precipitados, las células fueron incubadas por un tiempo variable (1-2 semanas) hasta la aparición de focos de lisis, adicionando medio de cultivo fresco cada 2-3 días a partir de la primera semana, permitiendo generar los adenovirus.

4.4.7 Cosecha de adenovirus

Una vez alcanzado ~60% de desprendimiento espontáneo de la capa celular (por el efecto citopático de la producción viral en las células), se realizó el proceso de cosecha viral. Las células transfectadas fueron colectadas por arrastre utilizando el propio medio de cultivo y centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos, a 22⁰C). El *pellet* celular (reserva viral de mayor título) fue resuspendido en PBS y vuelto a centrifugar en las mismas condiciones. Luego, el *pellet* fue será resuspendido en 1 ml de solución tampón 10 mM Tris-HCl (pH 8.1) y lisado mediante 3 ciclos sucesivos de congelación y descongelación (incubación en N₂ líquido, seguido de incubación a 37°C). La muestra fue centrifugada a 3500 rpm, por 10 minutos a 4⁰C, y el sobrenadante fue rescatado como fracción de virus recombinante de alto título. Con estas alícuotas se realizó las primeras evaluaciones de la capacidad infectiva y funcional de los adenovirus generados.

4.4.8 Transducción adenoviral de HUVEC

HUVEC fueron cultivadas hasta alcanzar ~70% de confluencia e infectadas con diluciones seriadas de los constructos adenovirales en medio M199. Para evaluar la eficiencia de la infección, se utilizó la reacción de β -galactosidasa (LacZ), marcador enzimático cuyo gen se encuentra en la secuencia del esqueleto adenoviral. Las células (sembradas en placas de 24 posillos) fueron incubadas (12 horas) en presencia del virus Ad-siIR-A, AdsiIR-B, y Ad-Control (-). La inhibición de la expresión de IR-A e IR-B fue evaluada por PCR y western blots dentro de las 48 horas siguientes a la transducción (Salomón y cols., 2012; Westermeier y cols., 2013).

4.5 Estimación del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la fórmula de comparación de las medias (Fernández, 1996) para determinar el número de muestras a ser incluidas por grupo. Se utilizaron los niveles de insulina previamente publicados en muestras de sangre de cordón umbilical de embarazos con diabetes gestacional (Lindsay y cols., 2007). Así:

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot S^2}{d^2} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde:

n = sujetos de estudio

$Z\alpha$ = valor de Z correspondiente al riesgo deseado para test unilateral (1.645)

$Z\beta$ = valor de Z correspondiente al poder estadístico del 90% (1.2820)

S^2 = varianza del grupo control (0.0016)

d^2 = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (0.00238)

Así,

$$n = \frac{2(1.645 + 1.2820)^2 \cdot 0.0016^2}{0.00238^2}$$

$$n = 7.74$$

De esta manera, se debió incluir al menos 8 muestras por grupo de embarazos normales y de diabetes gestacional por análisis para determinar diferencias en relación a los niveles de insulina.

4.6 Análisis de datos

La variación estadística de los promedios fue estimada usando la distribución normal y representada por el error estándar (S.E.M.). Al comparar dos valores se establecieron los límites de confianza, comparando los percentiles mediante el uso de la distribución *t* de Student (dos colas) y el test de Mann-Whitney. La comparación de más de dos grupos experimentales fueron realizados con el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y seguido de comparaciones *post hoc* con el test de Bonferroni. Los datos fueron analizados usando los programas Enzfitter v2.0 (Elsevier, Biosoft) y graficados mediante el programa Graphpad Prism v5.0d. Debido a que este último programa no permite el ingreso de datos que usen una coma como separador de decimales y con el fin de dar mayor claridad en el texto, los valores numéricos se presentaron con un punto como separador de fracciones decimales. Las diferencias con un valor de $P < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas de las embarazadas y los recién nacidos

En este estudio se utilizó un total de 63 muestras de cordones umbilicales humanos, de los cuales 35 provenían de embarazos normales (Normal) y 28 de embarazos diagnosticados con diabetes gestacional (todas las características clínicas de las embarazadas y de los recién nacidos se resumen en la Tabla 5). Las embarazadas correspondientes al grupo con DG mostraron un mayor nivel de glicemia a las 2 horas de ingesta de 75 gramos de glucosa (test de tolerancia a la glucosa), así como un nivel elevado de hemoglobina glicosilada. Además, se encontró un aumento en la concentración de insulina en pacientes diagnosticados con diabetes gestacional respecto a pacientes que cursaron su embarazo sin patologías asociadas (Normal). En concordancia con esto, se encontró que las embarazadas con diabetes gestacional presentan un mayor HOMA-IR y función de la célula β , y menor HOMA-IS con respecto a las embarazadas sin patología. Los recién nacidos provenientes de embarazos con diabetes gestacional mostraron un mayor índice ponderal por un mayor peso al nacer comparados con los recién nacidos provenientes de embarazos normales. Es importante destacar que los niños provenientes de embarazos con diabetes gestacional mostraron mayores niveles de insulina en sangre obtenida desde el cordón umbilical. En relación con esto, los recién nacido mostraron un mayor HOMA-IR y un menor HOMA-IS. No se observó diferencias significativas en los parámetros determinados en ambos grupos de estudio tanto en la madre (edad, estatura, peso, IMC, presión arterial sistólica, glicemia basal) como en el recién nacido (sexo, edad gestacional, estatura y glucosa en vena umbilical).

Tabla 5. Características clínicas de las madres y recién nacidos

VARIABLES	Normal (n=35)	DG (n = 28)
<i>Variables maternas</i>		
Edad (años)	28 ± 0.64 (18-38)	31 ± 0.59 (18-38)
Estatura (cm)	159 ± 1.5 (147-177)	159 ± 0.9 (147-185)
Peso (Kg)	68 ± 2.0 (54-92)	64 ± 1.4 (45-86)
IMC (Kg/cm ²)	26 ± 0.23 (22-29)	25 ± 0.37 (19-29)
Presión sistólica (mmHg)	107 ± 7.0 (103-107)	112 ± 6.0 (105-113)
Hemoglobina glicosilada (% del total)	4.0 ± 0.34 (3.2-5.1)	5.7* ± 0.1 (5.3-6.2)
Glicemia basal (mg/dl)	82 ± 0.92 (67-95)	83 ± 1.1 (67-114)
TTGO (mg/dl)		
Glicemia basal	88 ± 0.1 (69-97)	95 ± 1.9 (87-112)
Glicemia post carga de glucosa (2 horas)	98 ± 1.2 (65-114)	164* ± 2.5 (140-239)
Insulina plasmática (µU/ml)	5.2 ± 0.13 (4.9-5.6)	7.8* ± 0.7 (5.9-11.6)
HOMA-IR	1.1 ± 0.04 (0.8-1.3)	1.8* ± 0.1 (1.0-3.2)
HOMA-IS (%)	88 ± 3.0 (77.1-125.2)	54.6* ± 2.5 (31.2-78.6)
Función de la célula β (%)	80 ± 2.8 (73.4-85.3)	91.7* ± 3.1 (70.0-99)
<i>Variables del recién nacido</i>		
Sexo (femenino/masculino)	20/15	13 /15
Edad gestacional (semanas)	38 ± 0.34 (37-40)	38 ± 0.21 (37-40)
Peso al nacer (gramos)	3192 ± 44 (2580-3970)	4353* ± 51 (3800-5100)
Estatura (cm)	49 ± 3.6 (36-54)	49 ± 4.1 (43-55)
Índice ponderal (gramos/cm ³)	2.5 ± 0.03 (2.0-3.3)	3.7* ± 0.06 (3.1-5.7)
Glucosa en vena umbilical (mmol/L)	3.6 ± 0.4 (2.9-4.3)	4.5 ± 0.6 (4.2-4.9)
Insulina en vena umbilical (µU/mL)	6.1 ± 0.7 (5.5-7.9)	11.6* ± 0.6 (8.9-13.1)
HOMA-IR	0.98 ± 0.11 (0.7-1.5)	2.32* ± 0.39 (1.6-2.8)
HOMA-IS (%)	102 ± 22 (85-110)	43* ± 7.75 (30-60)

La glicemia materna fue evaluada en condiciones basales (ayuno de 12 horas) y 2 horas después de una carga oral de 75 gramos de glucosa en embarazadas normales (Normal) o con diagnóstico de diabetes gestacional (DG), como se describe en los métodos. Los valores son promedio ± SEM (rango), excepto para hemoglobina glicosilada donde corresponden al promedio ± DS (rango). Las pacientes diagnosticadas con DG fueron tratadas con dieta consistente en la administración de 30 a 35 calorías/kilo (peso corporal ideal) con un mínimo de 1800 calorías y entre 180-200 gramos de hidratos de carbono al día. IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, *homeostasis model assessment for insulin resistance*; HOMA-IS, *homeostasis model assessment for insulin sensitivity* (ver métodos). *P<0.05 versus embarazos normales.

5.2 Efecto de la diabetes gestacional sobre el transporte de L-arginina

En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional la captación de L-arginina (300 μM) fue mayor comparada con HUVEC normales (Figura 3). Al evaluar el transporte total de L-arginina en todo rango de concentraciones para este aminoácido usado en este estudio fue mayor en HUVEC con diabetes gestacional respecto a HUVEC normales (Figura 4A). El transporte total de L-arginina exhibió un componente lineal con una pendiente (K_D) de $20 \pm 2 (10^{-5})$ y $28 \pm 3 (10^{-5})$ (pmol/ μg proteínas/minuto)/ μM) en células normales y con diabetes gestacional, respectivamente. La representación de los datos de transporte es una gráfica de Eadie-Hofstee muestra que los valores se ajustan a una curva de decaimiento exponencial (participación de al menos dos sistemas de transporte) (Figura 4C).

El transporte de L-arginina en todo rango de concentraciones para este estudio fue mayor en diabetes gestacional respecto a HUVEC normales ajustado a una curva de Michaelis-Menten sin el componente lineal mostrando una cinética saturable y significativamente mayor en diabetes gestacional con respecto a HUVEC normales (Figura 4B), lo que se reflejó en una disminución de la V_{\max} sin cambios significativos en el valor de la K_m aparente en ambos grupos experimentales (Tabla 6). La representación de los datos de transporte en una gráfica de Eadie-Hofstee muestra que los valores se ajustan a una regresión lineal (participación de un sistema de transporte) (Figura 4D). Al analizar las capacidades de transporte (V_{\max}/K_m) se observó que el transporte en diabetes gestacional fue mayor comparado con células normales. Al estimar la contribución relativa entre ambos grupos se observó que en diabetes gestacional el transporte de L-arginina aumentó en ~ 3 veces con respecto a HUVEC normales (Tabla 6).

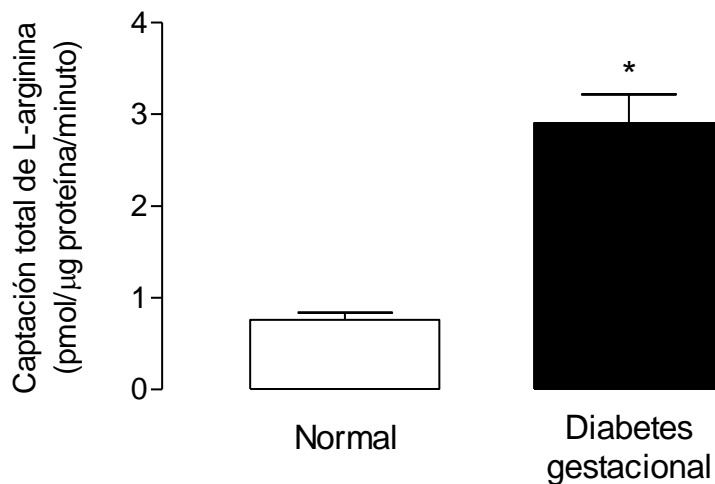


Figura 3. Diabetes gestacional aumenta la captación de L-arginina en HUVEC.

Células provenientes de embarazos normales (Normal) y con diabetes gestacional (Diabetes gestacional) fueron incubadas con 300 μM de L-arginina (3 $\mu\text{Ci/mL}$ L- ^3H arginina, 37°C, 1 minuto). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=12$. * $P<0.05$ con respecto a Normal.

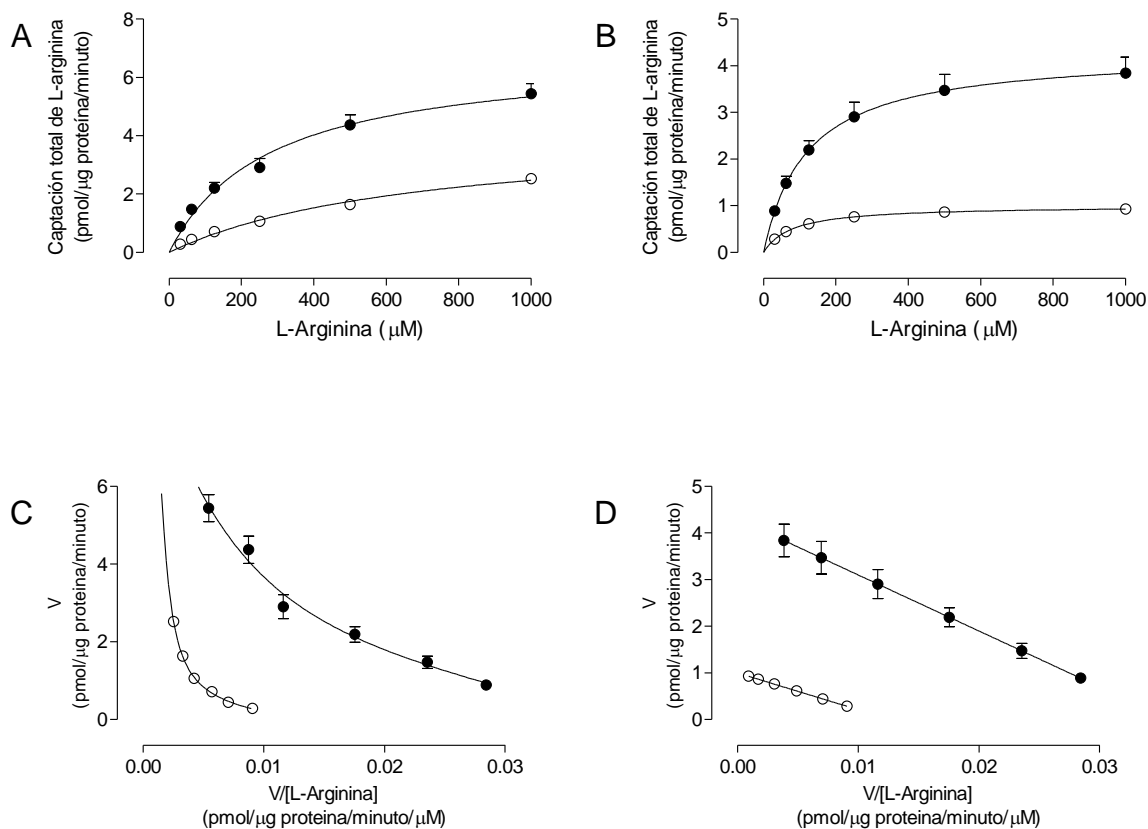


Figura 4. Diabetes gestacional aumenta el transporte total y saturable de L-arginina en HUVEC. El transporte de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales (○) o con diabetes gestacional (●). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μM, 3 μCi/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina total fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten más un componente lineal. (B) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (C-D) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A y B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=12.

Tabla 6. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en HUVEC.

Transporte de L-arginina					
	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X F$	K_D ($10^{-5} \mu$ M $^{-1}$)
<i>Normal</i>					
Control	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.003	1.0 \pm 0.2	20 \pm 2
Insulina	2.3 \pm 0.1*	93 \pm 22	0.024 \pm 0.006*	2.0 \pm 0.5*	25 \pm 3
<i>Diabetes gestacional</i>					
Control	4.3 \pm 0.3*	120 \pm 31	0.035 \pm 0.011*	2.9 \pm 0.9*	28 \pm 3
Insulina	2.2 \pm 0.5 \dagger	172 \pm 40	0.012 \pm 0.005 \dagger	1.0 \pm 0.4 \dagger	31 \pm 3

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales (*Normal*) y con diabetes gestacional (*Diabetes gestacional*) en ausencia y presencia de insulina. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/DG^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles provenientes de embarazos con diabetes gestacional sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m). K_D , corresponde al transporte de L-arginina lineal no saturable. * $P < 0.05$ con respecto a su control normal sin insulina. $\dagger P < 0.05$ con respecto al control normal con insulina. Valores corresponden a promedio \pm S.E.M. (n=5-12).

5.3 Efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina

Insulina aumentó la captación de L-arginina (300 μM) en HUVEC normales, sin embargo, en DG revertió parcialmente el efecto de diabetes gestacional (Figura 5). Estos efectos también fueron observados en todo el rango de concentraciones de L-arginina (Figura 6A). La representación de los datos de transporte en una gráfica de Eadie-Hofstee muestra que los valores se ajustan a una curva de decaimiento exponencial (participación de al menos dos sistemas de transporte) (Figura 6C). Los datos que fueron ajustados a una curva saturable de Michaelis-Menten (Figura 6B), mostrarón que insulina aumenta la V_{max} en HUVEC normales, y una disminuye la V_{max} en DG sin cambios en la K_m aparente para ambos grupos (Tabla 6). La transformación de Eadie-Hofstee mostró que los datos se ajustan a una regresión lineal (Figura 6D). Al analizar las eficiencias relativas se observó que el transporte en HUVEC con DG en presencia de insulina fue recuperado a valores de HUVEC normales, mientras que en células normales, insulina aumentó al doble la eficiencia relativa del transporte de L-arginina (Tabla 6).

5.4 Efecto de diabetes gestacional e insulina sobre la abundancia de la proteína hCAT-1 en HUVEC.

Diabetes gestacional (DG) se asoció con un aumento en la abundancia relativa de la proteína hCAT-1 respecto a células provenientes de embarazos normales (Figura 7A). La incubación de DG con insulina causó una disminución de la abundancia de la proteína hCAT-1 alcanzando valores cercanos a los observados en HUVEC normales en ausencia de insulina. Sin embargo, en HUVEC normales expuestas a esta hormona la abundancia de esta proteína aumentó respecto al valor observado en estas células en ausencia de insulina (Figura 7A).

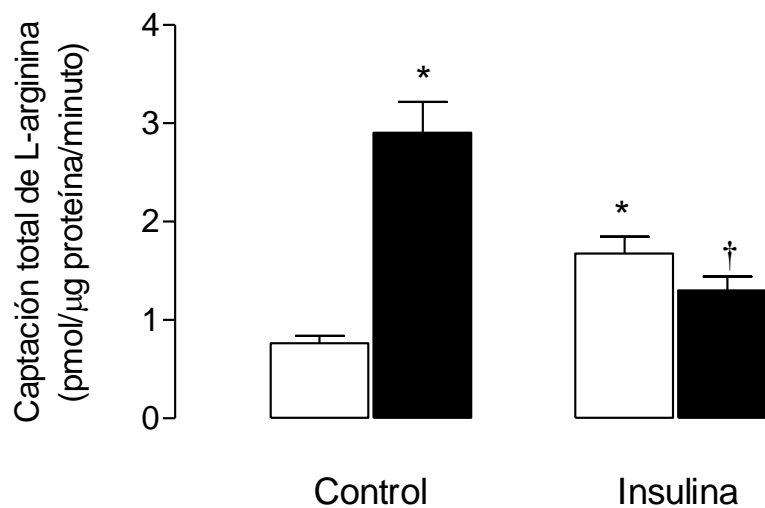


Figura 5. Insulina revierte el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos normales (*barra blanca*) y con diabetes gestacional (*barra negra*) fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de insulina (1 nM, 8 horas). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=12. * P <0.05 con respecto a Normal. † P <0.05 con respecto a diabetes gestacional sin insulina.

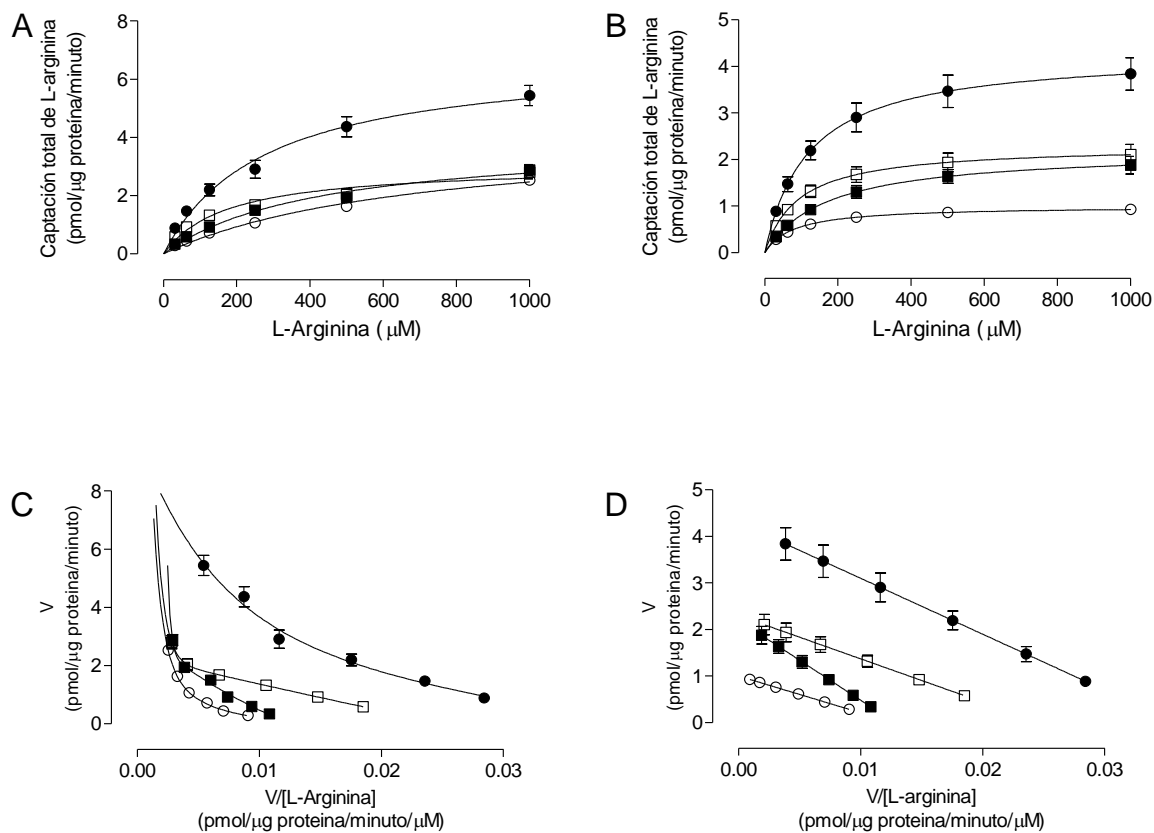


Figura 6. Insulina revierte el aumento del transporte total y saturable de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. El transporte de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales (\circ, \square) o con diabetes gestacional (\bullet, \blacksquare). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μM , 3 $\mu\text{Ci/mL}$ L- ^3H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (\circ, \bullet) y presencia (\square, \blacksquare) de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina total fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten más un componente lineal. (B) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (C-D) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A y B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=12$.

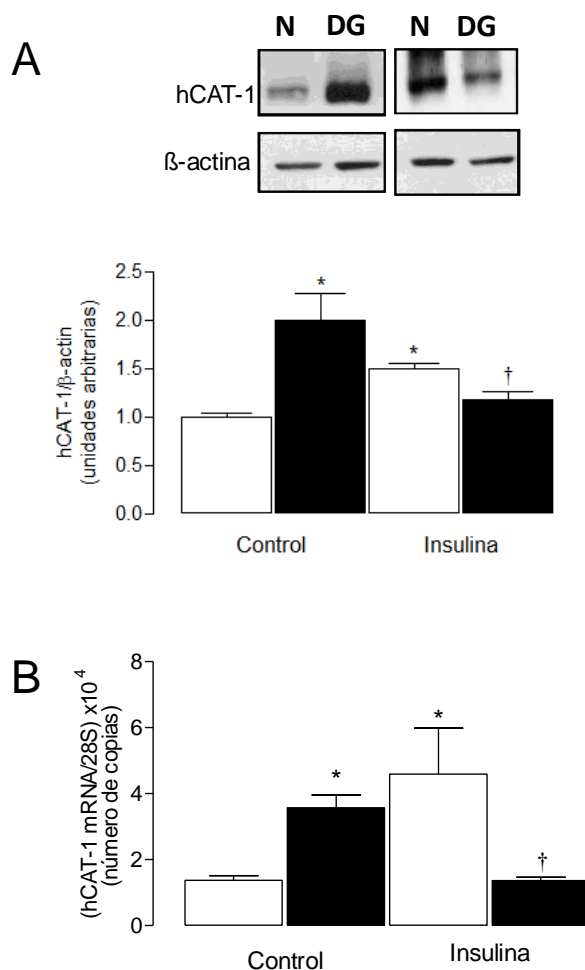


Figura 7. Insulina revierte el aumento de la abundancia de proteína y los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. (A) La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales (N, *barras blancas*) y de diabetes gestacional (DG, *barras negras*) mediante western-blot en ausencia (Control) y presencia (Insulina) de insulina. Se utilizaron anticuerpos *anti-hCAT-1* (1:250) y *anti-β-actina* (1:2500), como se describe en los métodos. Los westernblots en A provienen de la misma membrana. (B) Número de copias del mRNA para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales (N) y de diabetes gestacional (DG) mediante RT-PCR en tiempo real, en ausencia (Control) y presencia (Insulina) de insulina. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para hCAT-1 y 28S, como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=6$. * $P<0.05$ con respecto a Control en células N. † $P<0.05$ con respecto a Control en células DG.

5.5 Efecto de diabetes gestacional e insulina sobre los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC.

Diabetes gestacional se asoció con un aumento en el número de copias del mRNA que codifica para hCAT-1 respecto a células provenientes de embarazos normales (Figura 7B). Sin embargo, la incubación de HUVEC provenientes de embarazos de DG con insulina, causó una disminución en el mRNA de hCAT-1, alcanzando valores cercanos a los observados en HUVEC normales en ausencia de insulina. En HUVEC normales expuestas a esta hormona aumenta el mRNA de hCAT-1 respecto al valor observado en estas células en ausencia de insulina (Figura 7B).

5.6 Efecto de diabetes gestacional e insulina sobre la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*

Con el propósito de evaluar si los cambios de expresión se correlacionan con la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* se procedió a transfectar dos fragmentos del promotor de hCAT-1 (-1606 y -650 pb) en HUVEC normales y provenientes de embarazos con DG, en presencia y ausencia de insulina. Los resultados muestran que en DG existe una mayor actividad transcripcional en ambos fragmentos, y que insulina revierte el efecto de diabetes gestacional a valores observados en HUVEC normales en ausencia de insulina. Mientras que en HUVEC normales en presencia de insulina aumenta la actividad transcripcional en ambos fragmentos (Figura 8)

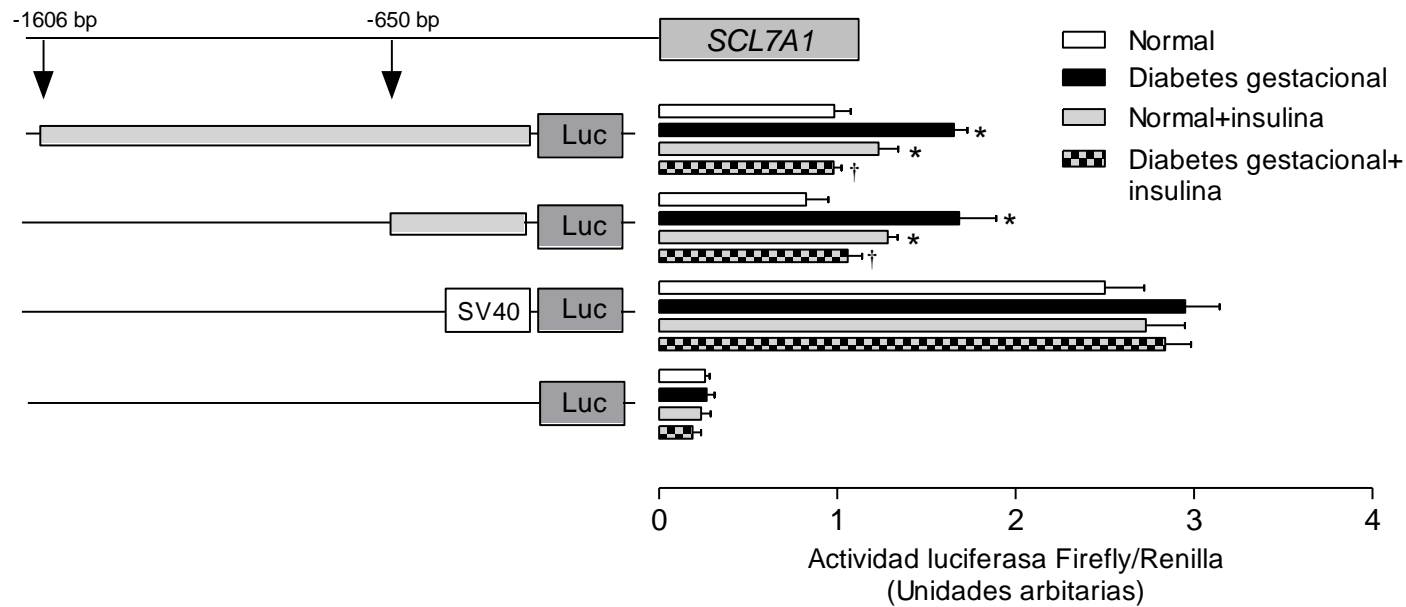


Figura 8. Insulina revierte el aumento de la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos normales (barras blancas y grises) o con diabetes gestacional (barras negras y grises achuradas) fueron transfectadas con 2 fragmentos del promotor de *SLC7A1* (pGL3-hCAT-1⁻¹⁶⁰⁶ y pGL3-hCAT-1⁻⁶⁵⁰) insertados río arriba de reportero de *luciferasa firefly* (*luc*). La actividad luciferasa relativa (razón entre la actividad de luciferasa *firefly*/luciferasa *renilla*), fue determinada en lisado celular (48 post infección) en ausencia (barras blancas y negras) y presencia (barras grises y grises achuradas) de insulina (1 nM, 8 horas). Las células fueron además transfectadas con los vectores pGL3-SV40 (virus simiano 40) y el vector pGL3-Basic (sin promotor) como controles positivos y negativos, respectivamente, como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=10. * $P<0.05$ con respecto a su control (barra blanca) para cada constructo. † $P<0.05$ con respecto a células DG (barras negras).

5.7 Efecto de diabetes gestacional sobre la expresión de las isoformas A y B del receptor de insulina en HUVEC.

La expresión del mRNA de IR-A fue mayor en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional (DG) con respecto a células normales, sin cambios significativos en la expresión de IR-B en ambos tipos celulares. La razón IR-A/IR-B fue mayor en DG respecto a células normales (Figura 9).

5.8 Silenciamiento de IR-A e IR-B en HUVEC

Con el propósito de evaluar la participación de IR-A e IR-B en los efectos mediados por insulina HUVEC, se generaron adenovirus partidores de siRNA contra estas isoformas en el laboratorio (Westermeier y cols., 2013; Salomón et al., 2012). Mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real fue posible determinar en HUVEC normales que la infección (100 MOI (*multiplicity of infection*)) en forma independiente de Ad-IR-A y Ad-IR-B causó una disminución de la expresión del mRNA de IR-A ($IC_{50} = \sim 24$ MOI, Figura 10A) e IR-B ($IC_{50} = \sim 10$ MOI, Figura 10B), respectivamente. Ensayos en paralelo demostraron la especificidad de los adenovirus generados, confirmando que la infección con Ad-IR-A no afectó la expresión de IR-B (Figura 11A) y a su vez la infección con Ad-IR-B no modificó significativamente la expresión de IR-A (Figura 11B).

5.9 Efecto de insulina sobre la expresión de las isoformas A y B del receptor de insulina en HUVEC.

Insulina restableció la expresión de IR-A en HUVEC provenientes de DG al nivel observado en células normales restableciendo también la razón IR-A/IR-B; sin embargo, no modificó la expresión de IR-B en ninguno de los grupos (Figura 12).

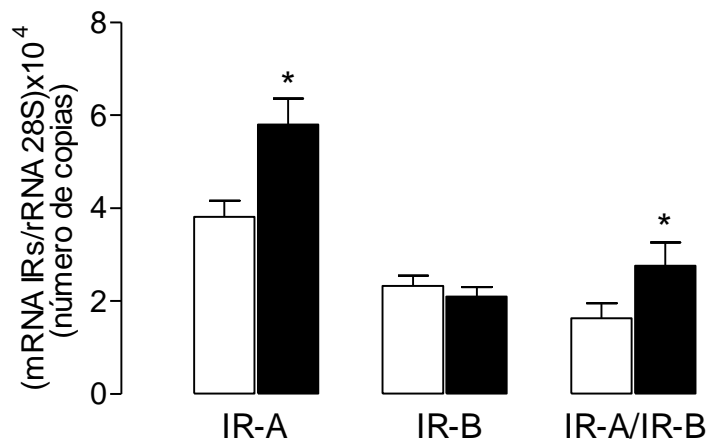


Figura 9. Diabetes gestacional se asocia con aumento en los niveles de mRNA para IR-A. El número de copias del mRNA de las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina humano fue determinado en células provenientes de embarazos normales (barras blancas) o con diabetes gestacional (barras negras) mediante RT-PCR en tiempo real. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para IR-A, IR-B y 28S, como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=6$. $P<0.05$ con respecto a su control normal.

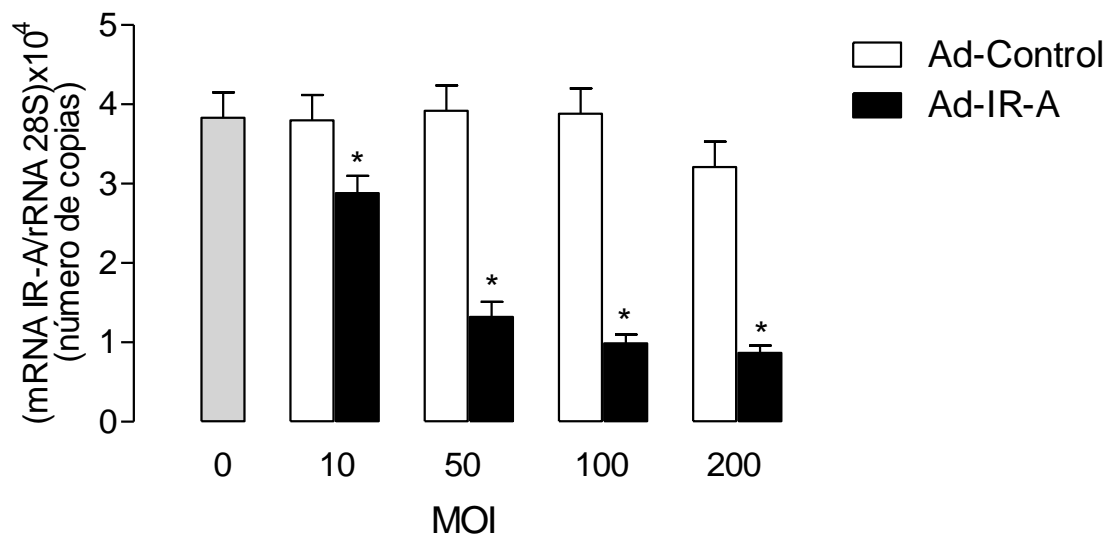


Figura 10. Silenciamiento de las isoformas A y B del receptor de insulina mediante siRNA en HUVEC. El número de copias del mRNA de las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina humano fue determinado en células HUVEC normales mediante RT-PCR en tiempo real en ausencia o presencia de adenovirus portadores del siRNA contra IR-A (Ad-IR-A), IR-B (Ad-IR-B), y control (Ad-Control). Control sin infección se representa en la barra gris. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para IR-A, IR-B y 28S, como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M, n=6. * $P < 0.05$ con respecto a su correspondiente Ad-Control.

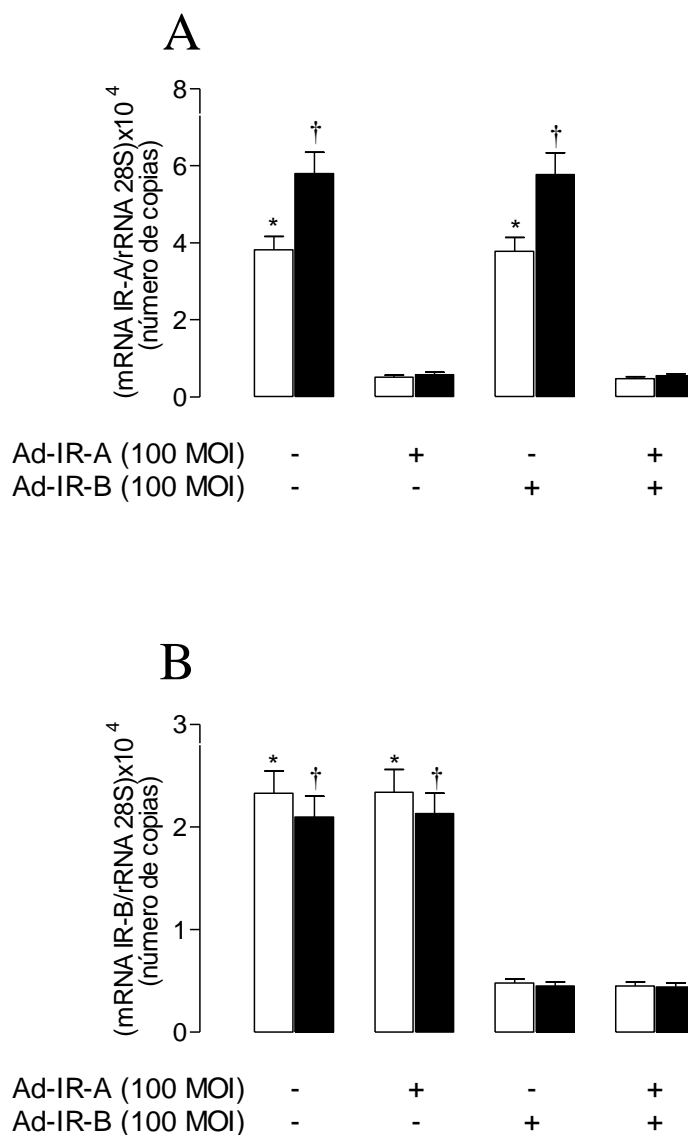


Figura 11. Silenciamiento específico de las isoformas A y B del receptor de insulina mediante siRNA en HUVEC. El número de copias del mRNA de las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina humano fueron determinados en células HUVEC normales (barras blancas) y DG (barras negras) mediante RT-PCR en tiempo real en ausencia (-) o presencia (+) de adenovirus portadores del siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), e IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para IR-A, IR-B y 28S, como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M, n=6. En A, * $P < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con el Ad-IR-A. † $P < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con Ad-IR-A y al control en ausencia de adenovirus. En B, * $P < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con el Ad-IR-B. † $P < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con Ad-IR-B.

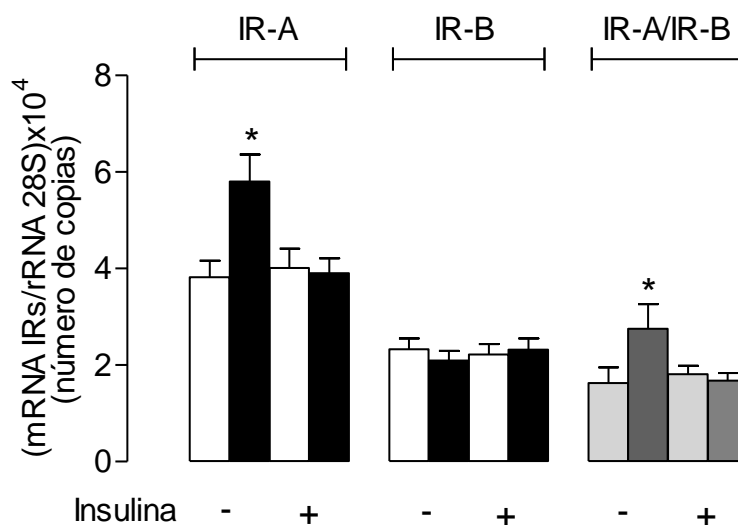


Figura 12. Insulina revierte el aumento de los niveles de mRNA para IR-A en HUVEC de diabetes gestacional. El número de copias del mRNA de las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina humano fue determinado en células provenientes de embarazos normales (barras blancas) o con diabetes gestacional (barras negras) mediante RT-PCR en tiempo real en ausencia (-) o presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas). En barras grises se muestran las relaciones entre IR-A e IR-B en ausencia y presencia de insulina. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para IR-A, IR-B y 28S, como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6. * $P < 0.05$ con respecto a HUVEC en presencia de insulina y HUVEC normales en ausencia y presencia de insulina.

5.10 Participación de IR-A e IR-B en la captación de L-arginina en HUVEC.

Para evaluar la participación de IR-A e IR-B en la captación de L-arginina en HUVEC normales y HUVEC de diabetes gestacional, ambos tipos celulares fueron transducidos con Ad-IR-A y Ad-IR-B. Como se observó previamente insulina aumentó la captación de L-arginina en HUVEC normales; sin embargo, este efecto fue bloqueado al transducir estas células con Ad-IR-A y/o Ad-IR-B (Figura 13). Mientras que el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC con diabetes gestacional que fue bloqueado por insulina fue recuperado sólo en células transducidas con Ad-IR-A (Figura 13).

5.11 Participación de IR-A e IR-B en el transporte de L-arginina en HUVEC.

Como se indicó, en células HUVEC normales insulina aumentó la V_{\max} y la razón V_{\max}/K_m del transporte de L-arginina con respecto a las células en ausencia de esta hormona (ver Figura 6). Sin embargo, en células transducidas con Ad-IR-A y/o Ad-IR-B, el efecto de insulina fue bloqueado en estos parámetros (Figura 14A, Tabla 7). En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, insulina disminuyó la V_{\max} y la razón V_{\max}/K_m del transporte de L-arginina con respecto a las células en ausencia de esta hormona (ver Figura 6). Este efecto de insulina fue bloqueado sólo en células transducidas con el Ad-IR-A, sin observarse cambios en células transducidas con Ad-IR-B (Figura 14C). El valor de K_m aparente no varió significativamente en ninguna condición experimental en ambos tipos celulares (Tabla 7).

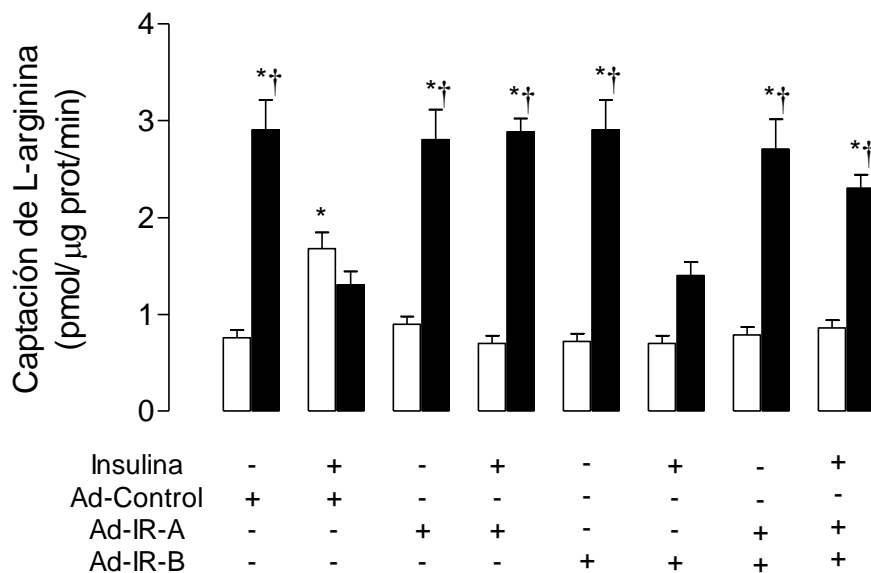
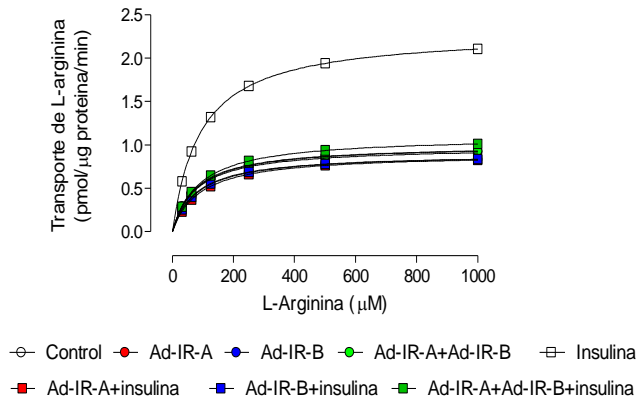
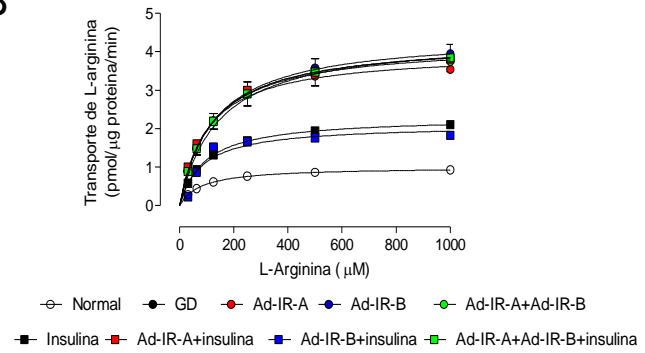


Figura 13. Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos normales (Normal, *barras blancas*) y con diabetes gestacional (DG, *barras negras*) fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI) o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=5. * P <0.05 con respecto a Normal transfectadas con Ad-Control en ausencia de insulina, Ad-IR-A y/o IR-B en ausencia y presencia de insulina. † P <0.05 con respecto a DG transfectadas con Ad-Control y con Ad-IR-B en presencia de insulina.

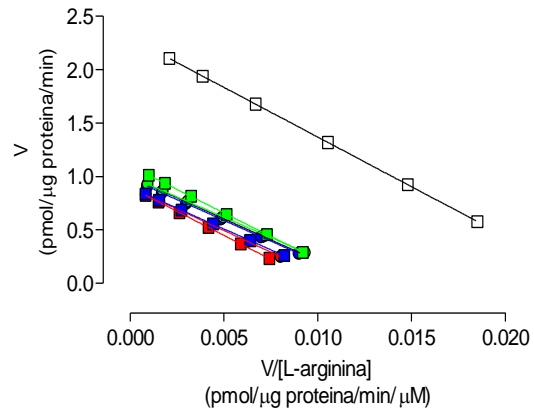
A



B



C



D

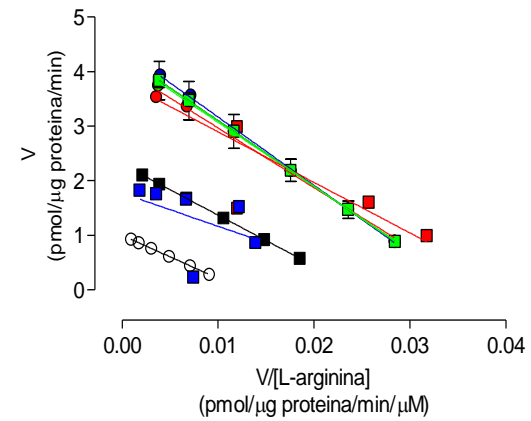


Figura 14 continúa en la página 72

Figura 14. Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional.

El transporte de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales (A,C) o con diabetes gestacional (B,D). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μM , 3 $\mu\text{Ci/mL}$ L-[^3H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI) o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI) como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal en células Normales. (B) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal en células provenientes de embarazos con diabetes gestacional. (C-D) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A y B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

Tabla 7. Efecto del silenciamiento de las isoformas del receptor de insulina sobre los parámetros cinéticos del transporte de L-arginina saturable en HUVEC.

Transporte saturable de L-arginina						
	V_{max} (pmol/μg proteína/ minuto)	K_m (μM)	V_{max}/K_m (pmol/μg proteína/minuto/ (μM))	$1/C^X F$	$1/DG^X F$	$K_D (10^{-5})$ (pmol/μg proteína/ minuto/ (μM))
Normal						
Sin insulina						
Control	1.0 ± 0.1	79 ± 46	0.012 ± 0.001	1.0 ± 0.1	-	20 ± 2
Ad-IR-A	0.9 ± 0.1	81 ± 30	0.011 ± 0.001	0.9 ± 0.1	-	24 ± 3
Ad-IR-B	0.9 ± 0.1	78 ± 32	0.012 ± 0.001	1.0 ± 0.1	-	28 ± 3
Ad-IR-A+	1.0 ± 0.1	76 ± 46	0.013 ± 0.001	1.1 ± 0.1	-	29 ± 3
Ad-IR-B						
Con insulina						
Control	2.3 ± 0.1*	93 ± 22	0.024 ± 0.006*	2.0 ± 0.5*	-	25 ± 3
Ad-IR-A	0.9 ± 0.1†	90 ± 33	0.010 ± 0.001†	0.8 ± 0.1†	-	26 ± 3
Ad-IR-B	0.9 ± 0.1†	78 ± 38	0.011 ± 0.001†	0.9 ± 0.1†	-	24 ± 2
Ad-IR-A+	1.1 ± 0.1†	88 ± 46	0.012 ± 0.001†	1.0 ± 0.1†	-	22 ± 2
Ad-IR-B						
DG						
Sin insulina						
Control	4.3 ± 0.3 [#]	120 ± 27	0.035 ± 0.003 [#]	2.9 ± 0.2 [#]	1.0 ± 0.1	28 ± 3
Ad-IR-A	3.9 ± 0.7 [#]	102 ± 65	0.038 ± 0.003 [#]	3.1 ± 0.3 [#]	1.1 ± 0.1	25 ± 3
Ad-IR-B	4.4 ± 0.3 [#]	127 ± 27	0.034 ± 0.003 [#]	2.8 ± 0.2 [#]	1.0 ± 0.1	30 ± 3
Ad-IR-A+	4.2 ± 0.3 [#]	115 ± 27	0.036 ± 0.004 [#]	3.0 ± 0.3 [#]	1.0 ± 0.1	28 ± 3
Ad-IR-B						
Con insulina						
Control	2.2 ± 0.5 [‡]	172 ± 40	0.012 ± 0.001 [‡]	1.0 ± 0.1 [‡]	0.3 ± 0.1 [‡]	31 ± 3
Ad-IR-A	4.1 ± 0.2 [#]	185 ± 38	0.022 ± 0.001*	1.8 ± 0.2*	0.6 ± 0.1	27 ± 3
Ad-IR-B	2.2 ± 0.2 [‡]	187 ± 49	0.011 ± 0.001 [‡]	0.9 ± 0.1 [‡]	0.3 ± 0.1 [‡]	33 ± 4
Ad-IR-A+	4.3 ± 0.4 [#]	115 ± 21	0.037 ± 0.003 [#]	3.1 ± 0.3 [#]	1.1 ± 0.1	28 ± 3
Ad-IR-B						

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales (Normal) y con diabetes gestacional (DG) en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI) o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI) como se describen en los métodos. V_{max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{max}/K_m); $1/DG^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles provenientes de embarazos con diabetes gestacional sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{max}/K_m). K_D , corresponde al transporte de L-arginina lineal no saturable. * $P < 0.05$ con respecto a su control normal sin insulina. † $P < 0.05$ con respecto al control normal con insulina. # $P < 0.05$ con respecto a su control normal sin y con insulina. ‡ $P < 0.05$ con respecto a su control DG sin insulina. Valores corresponden a promedio ± S.E.M. (n=6-12).

5.12 Participación de IR-A e IR-B en la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC.

Como se comentó anteriormente, en HUVEC normales insulina aumentó la abundancia relativa de la proteína hCAT-1 (ver Figura 7A). El efecto de insulina sobre la abundancia de proteína de hCAT-1 fue bloqueado en células *knock-down* para las isoformas A (IR-A) y/o B (IR-B) del receptor de insulina (Figura 15A). Sin embargo, en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, el efecto de insulina se asoció con un aumento en la abundancia relativa de la proteína hCAT-1, efecto que fue bloqueado por insulina (ver Figura 7A). El efecto de insulina observado en estas células fue bloqueado sólo en las células *knock-down* para la isoforma A del receptor de insulina (IR-A) (Figura 15B).

5.13 Participación de IR-A e IR-B en los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC.

Como se observó previamente, insulina aumentó el número de copias del mRNA para hCAT-1 en células normales (ver Figura 7B); sin embargo fue bloqueado al transducir estas células con adenovirus que contenían el siRNA para ambas isoformas (A y B) del receptor de insulina (IR-A e IR-B) (Figura 16A). Por otro lado, en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, donde estas células se asociaron con un aumento en el número de copias del mRNA, insulina causó una disminución en el mRNA de hCAT-1, alcanzando valores cercanos a los observados en HUVEC normales en ausencia de insulina (ver Figura 7B). De manera interesante, el efecto de insulina solo fue bloqueado en presencia de adenovirus que contenían el siRNA para la isoforma A del receptor de insulina (IR-A).

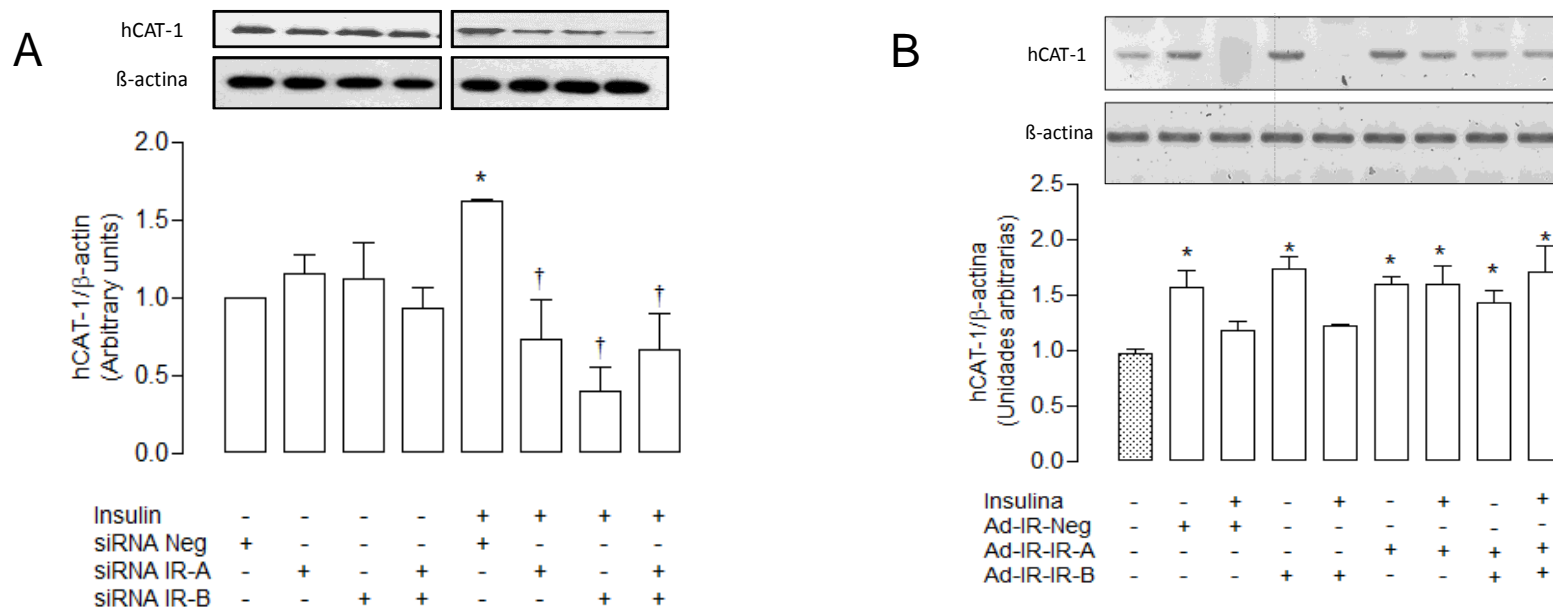


Figura 15. Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales (A) y de diabetes gestacional (B) mediante western-blot en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI). Se utilizaron anticuerpos *anti*-hCAT-1 (1:250) y *anti*-β-actina (1:2500), como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=6. En A, * $P < 0.05$ con respecto al resto de condiciones. En B, * $P < 0.05$ con respecto a control normal (barra gris), células DG transfectadas con Ad-Control y Ad-IR-B en presencia de insulina.

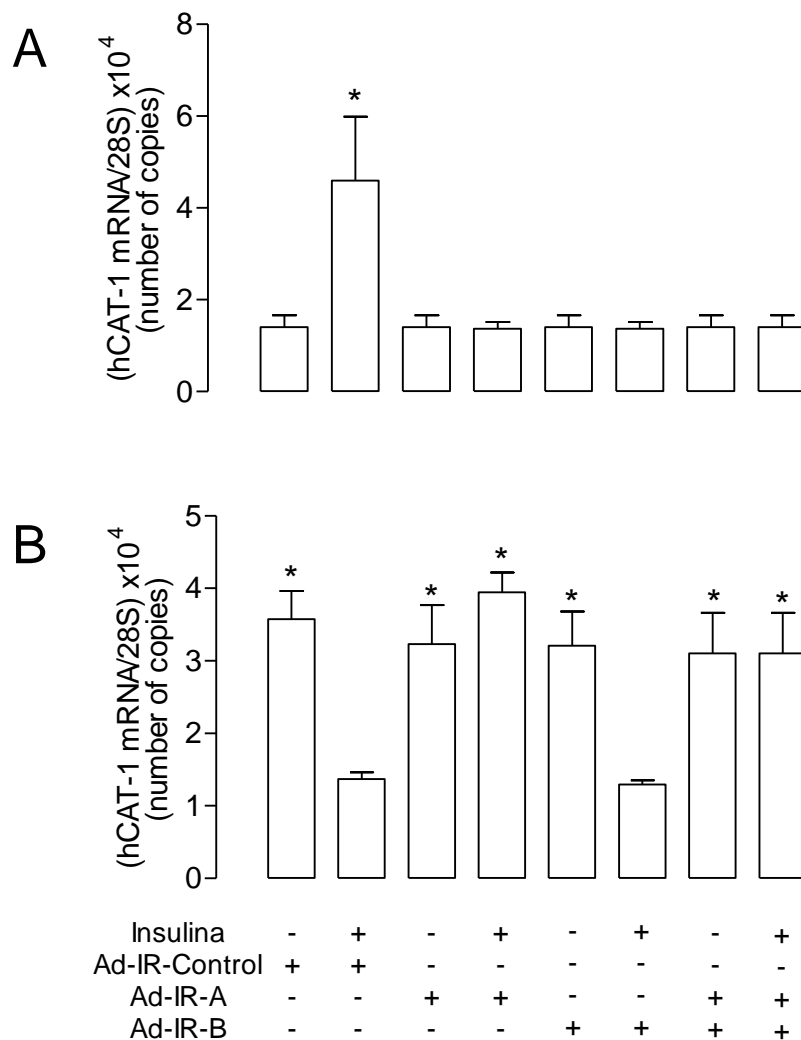
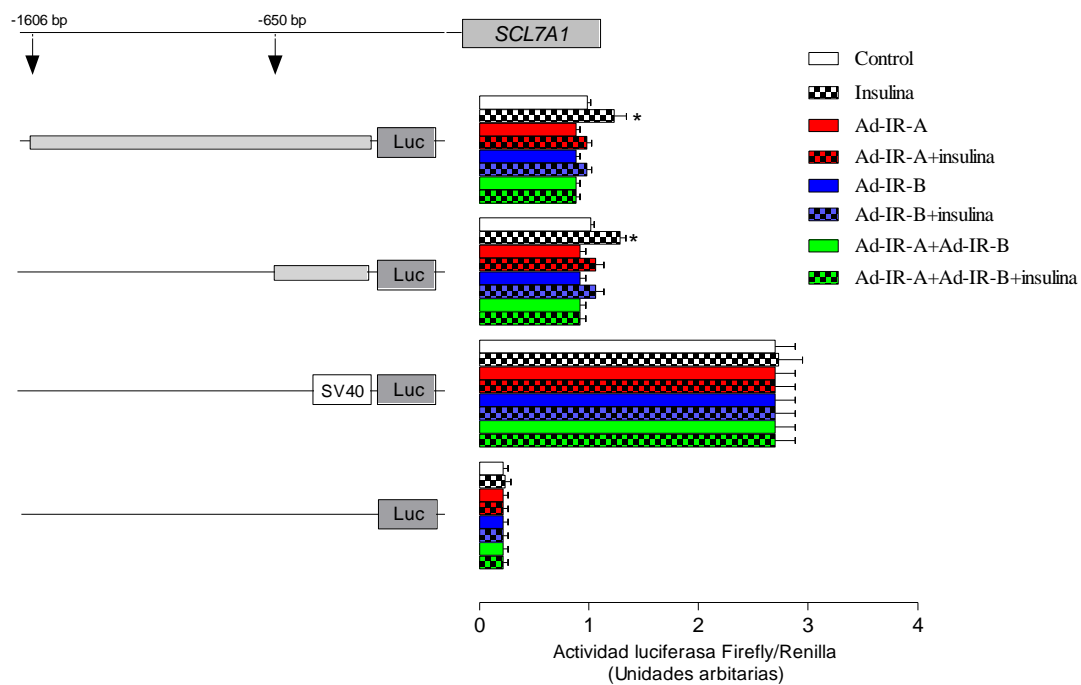


Figura 16. Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. Número de copias del mRNA para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales (A) y de diabetes gestacional (B) mediante RT-PCR en tiempo real, en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para hCAT-1 y 28S, como se describen los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6. En A, * P <0.05 con respecto al resto de las condiciones. En B, * P <0.05 con respecto a control normal en A, y células DG transfectadas con Ad-control y Ad-IR-B en presencia de insulina.

5.14 Participación de IR-A e IR-B sobre la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en HUVEC.

Con el propósito de evaluar si los cambios de expresión se correlacionan con la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* se procedió a transfectar dos fragmentos del promotor de hCAT-1 (-1606 y -650 pb) en HUVEC normales y provenientes de embarazos con diabetes gestacional, en presencia y ausencia de insulina, y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A y/o IR-B. Los resultados muestran que insulina aumenta la actividad transcripcional de *SLC7A1* en ambos fragmentos, los cuales son bloqueados en presencia de los adenovirus para IR-A y/o IR-B (Fig 17A). Mientras que en diabetes gestacional existe una mayor actividad transcripcional en ambos fragmentos, e insulina revierte el efecto de diabetes gestacional a valores observados en HUVEC normales en ausencia de insulina. Sin embargo, este efecto sólo fue bloqueado en presencia de adenovirus para IR-A en ambos fragmentos (Figura 17B). De manera interesante, HUVEC provenientes de diabetes gestacional poseen una mayor actividad transcripcional que HUVEC normales en ambos fragmentos (Figuras 17C y 17D).

A



B

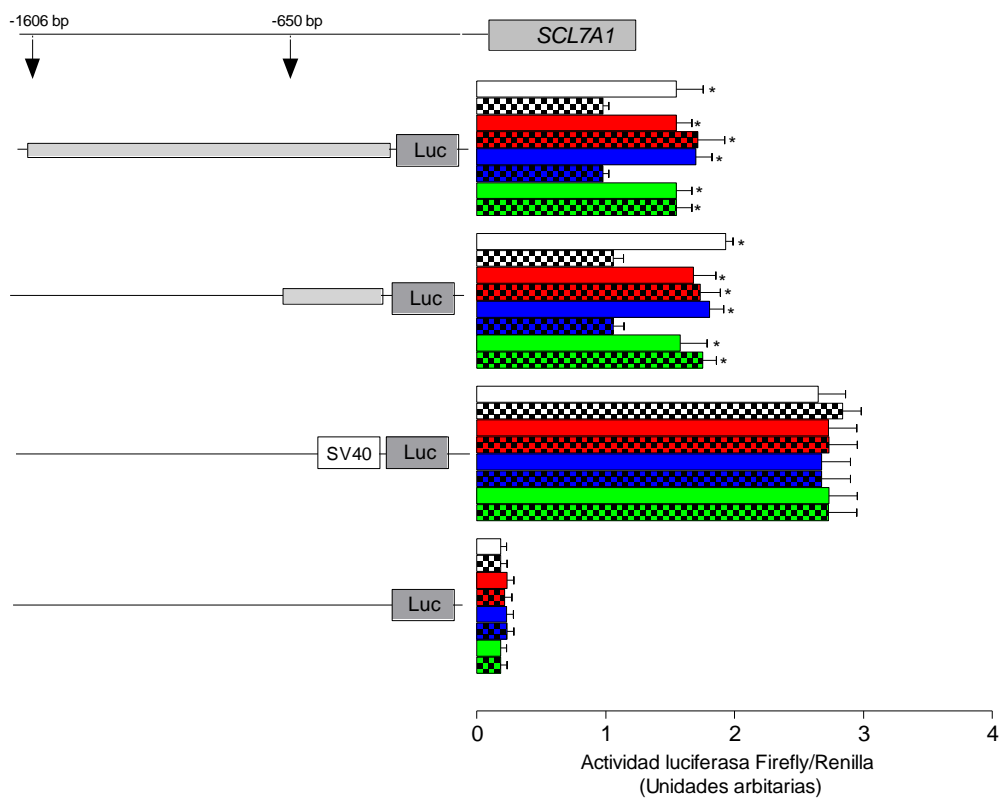
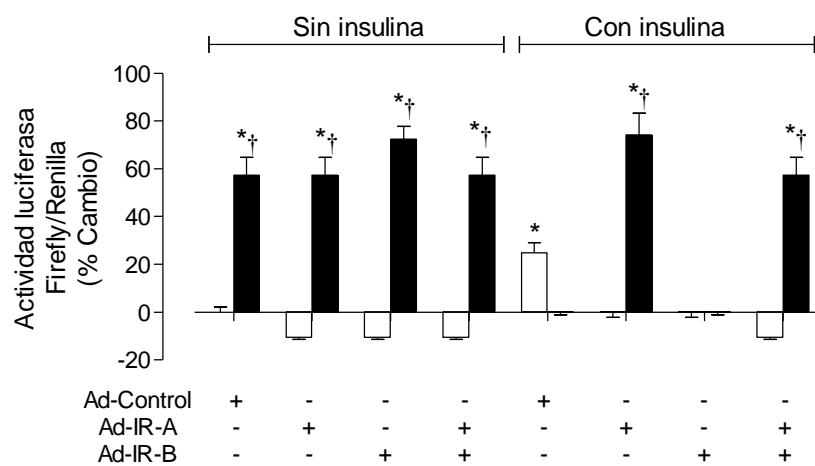


Figura 17 continúa en la siguiente página

C, -1606 pb



D, -650 pb

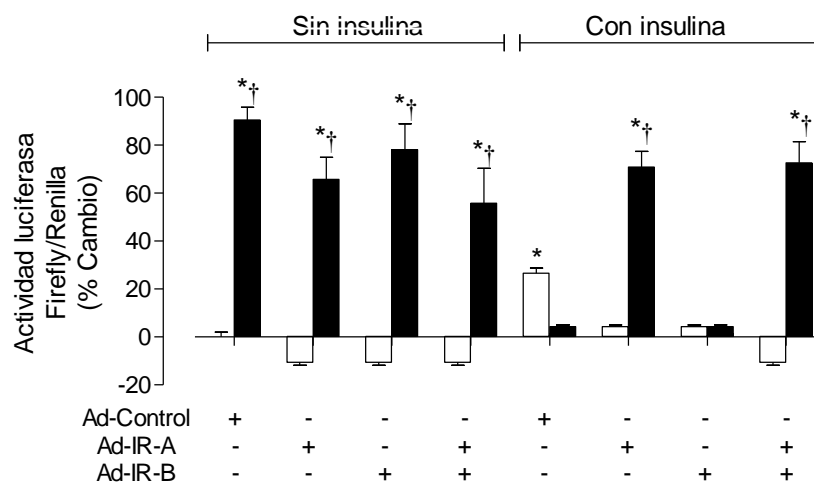


Figura 17. Insulina requiere de IR-A para revertir el aumento de la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*. Células provenientes de embarazos normales (A) o con diabetes gestacional (B) fueron transfectadas con 2 fragmentos del promotor de *SLC7A1* (pGL3-hCAT-1⁻¹⁶⁰⁶ y pGL3-hCAT-1⁻⁶⁵⁰) insertados río arriba de reportero de *luciferasa firefly* (*luc*). La actividad luciferasa relativa (razón entre la actividad de luciferasa *firefly*/luciferasa *renilla*), fue determinada en lisado celular (48 post infección) en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI). Las células fueron además transfectadas con los vectores pGL3-SV40 (virus simiano 40) y el vector pGL3-Basic (sin promotor)

como controles positivos y negativos, respectivamente, como se describe en los métodos. C y D corresponden al porcentaje (%) de la actividad luciferasa para células normales (*barras blancas*) y con diabetes gestacional (*barras negras*) con respecto al control en el fragmento de -1606 y -650 pb, respectivamente, de acuerdo a los valores obtenidos en A y B,. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=10. En A, * $P < 0.05$ con respecto al resto de las condiciones. En B, * $P < 0.05$ con respecto a Control en A, y respecto a células en presencia de insulina en control y Ad-IR-B. En C y D, * $P < 0.05$ con respecto a Ad-Control, Ad-IR-A, y/o Ad-IR-B en células normales sin insulina; Ad-IR-A y/o Ad-IR-B en células normales con insulina; Ad-Control y Ad-IR-B en células con diabetes gestacional con insulina. † $P < 0.05$ con respecto a células normales con Ad-Control en presencia de insulina.

5.15 Efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre la captación de L-arginina en HUVEC.

En HUVEC provenientes de embarazos normales la activación e inhibición por agonistas y antagonistas de receptores adenosina de A_1 (CPA, DPCPX), A_{2A} (CGS-21680, ZM-241385), A_{2B} (NECA, MRS1754) y A_3 (2-Cl-IB-MECA, MRS1523), no mostraron cambios sobre la captación de L-arginina (Figura 18A). Sin embargo, estas células aumentan la captación de L-arginina al ser incubadas con insulina, este efecto fue bloqueado al incubar estas células con ZM-241385 (antagonista de receptores de adenosina A_{2A}) en ausencia y presencia de CGS-21680 (agonista de receptores de adenosina A_{2A}) (Figura 18B). Por otro lado, células HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional muestran una mayor captación de L-arginina con respecto a células normales. El efecto de diabetes gestacional sólo fue bloqueada parcialmente al usar ZM-241385 en ausencia y presencia de CGS-21680 (Figura 19A). Pero si estas células son incubadas en presencia de insulina, la captación de L-arginina vuelve a valores observados en células normales en ausencia de insulina. Este efecto de insulina fue bloqueado al utilizar un antagonista de receptores de adenosina A_1 (DPCPX) en ausencia y presencia de un agonista para este receptor (CPA). Además, el efecto de insulina también fue bloqueado por el agonista del receptor de adenosina A_{2A} (CGS-21680), pero revertido en presencia del antagonista de este receptor (ZM-241385) (Figura 19B).

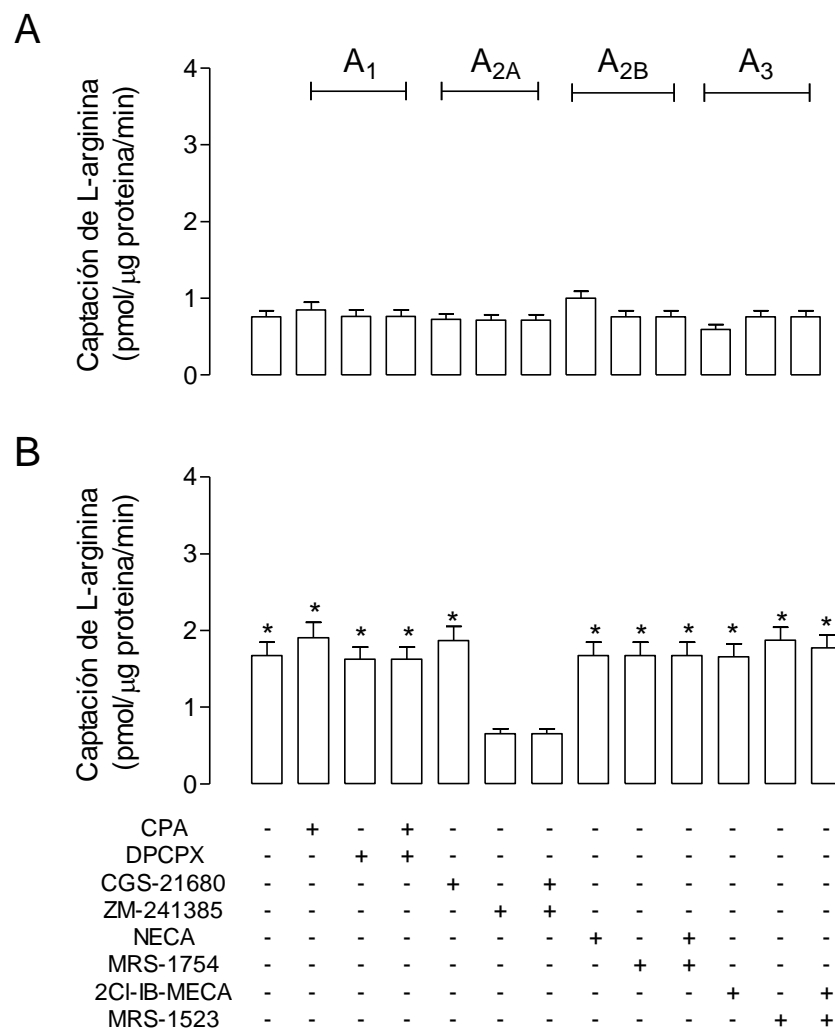


Figura 18. Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A_{2A} para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales. Células provenientes de embarazos normales fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas (CPA, CGS-21680, NECA, 2-Cl-IB-MECA) y antagonistas (DPCPX, ZM-241385, MRS1754, MRS1523) de receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente. La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12. En B, * P <0.05 con respecto a todos los valores observados en A, y a las células incubadas con insulina en presencia de ZM-241385.

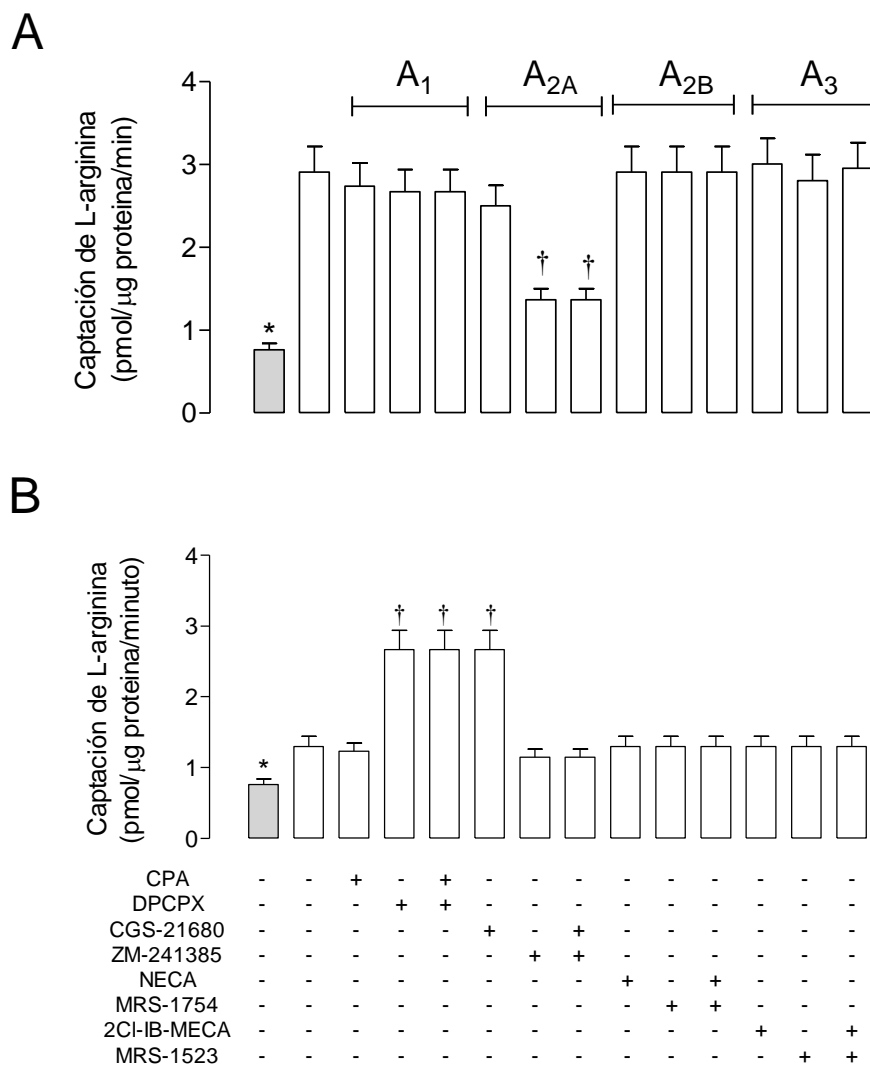


Figura 19. Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A_1 para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos con diabetes gestacional fueron incubadas con 300 μM de L-arginina (3 $\mu\text{Ci/mL}$ L- ^3H arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas (CPA, CGS-21680, NECA, 2-CI-IB-MECA) y antagonistas (DPCPX, ZM-241385, MRS1754, MRS1523) de receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente. En A y B, la barra gris corresponde a las células normales en ausencia de insulina. La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=6-12$. En A, $*P<0.05$ con respecto al resto de los valores observados en A. $\dagger P<0.05$ con respecto al resto de los valores, excepto células normales. En B, $*P<0.05$ con respecto al resto de los valores observados en B. $\dagger P<0.05$ con respecto al resto de los valores, excepto células normales.

5.16 Efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC.

En HUVEC provenientes de embarazos normales la activación e inhibición por agonistas y antagonistas de receptores adenosina de A_1 (CPA, DPCPX), A_{2A} (CGS-21680, ZM-241385), A_{2B} (NECA, MRS1754) y A_3 (2-Cl-IB-MECA, MRS1523), no mostraron cambios sobre la V_{max} , K_m y la V_{max}/K_m del transporte saturable de L-arginina (Figura 20A, Tabla 8). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figura 20B). Sin embargo, estas células aumentan la V_{max} , y la V_{max}/K_m en el transporte saturable de L-arginina al ser incubadas con insulina, este efecto fue bloqueado al incubar estas células con un antagonista de receptores de adenosina A_{2A} (ZM-241385) en ausencia y presencia de un agonista de receptores de adenosina A_{2A} (CGS-21680) (Figura 21A, Tabla 8). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figura 21B). Por otro lado, células HUVEC provenientes de embarazos con Diabetes gestacional muestran un mayor transporte de L-arginina con respecto a células normales. El efecto de diabetes gestacional sólo fue bloqueada parcialmente al usar ZM-241385 en ausencia y presencia de CGS-21680 (Figura 22A, Tabla 9). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figura 22B). Pero si estas células son incubadas en presencia de insulina, la captación de L-arginina vuelve a valores observados en células normales en ausencia de insulina. Este efecto de insulina fue bloqueado al utilizar un antagonista de receptores de adenosina A_1 (DPCPX) en ausencia y presencia de un agonista para este receptor (CPA). Además, el efecto de insulina también fue bloqueado por el agonista del receptor de adenosina A_{2A} (CGS-21680), pero revertido en presencia del antagonista de este receptor (ZM-241385) (Figura 23A, Tabla 9). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figura 23B).

Tabla 8. Parametros cinéticos del transporte saturable de L-arginina por activación de receptores de adenosina en HUVEC provenientes de embarazos normales.

Transporte de L-arginina					
	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/Ins^X_F$
<i>Sin insulina</i>					
Control	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.008	1.0 \pm 0.6	
ZM-241385	1.0 \pm 0.1	99 \pm 33	0.010 \pm 0.004	0.8 \pm 0.3	
DPCPX	1.0 \pm 0.1	77 \pm 40	0.012 \pm 0.004	1.0 \pm 0.6	
MRS-1754	1.2 \pm 0.1	71 \pm 16	0.017 \pm 0.009	1.4 \pm 0.7	
MRS-1523	1.1 \pm 0.1	67 \pm 21	0.016 \pm 0.008	1.3 \pm 0.6	
CGS-21680	1.1 \pm 0.2	128 \pm 15	0.008 \pm 0.002	0.7 \pm 0.2	
CPA	1.2 \pm 0.1	103 \pm 21	0.011 \pm 0.003	0.9 \pm 0.2	
NECA	1.5 \pm 0.1	79 \pm 21	0.018 \pm 0.005	1.5 \pm 0.4	
2CI-IB-MECA	1.0 \pm 0.1	62 \pm 23	0.016 \pm 0.007	1.3 \pm 0.6	
ZM-241385	1.0 \pm 0.1	90 \pm 33	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	
CGS-21680					
DPCPX	1.1 \pm 0.1	75 \pm 40	0.014 \pm 0.001	1.2 \pm 0.1	
CPA					
MRS-1754	1.0 \pm 0.1	70 \pm 16	0.014 \pm 0.001	1.2 \pm 0.1	
NECA					
MRS-1523	1.3 \pm 0.1	69 \pm 21	0.018 \pm 0.008	1.5 \pm 0.6	
2CI-IB-MECA					

La tabla continúa en la próxima página.

Continuación

	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/ $(\mu$ M))	$1/C^X_F$	$1/Ins^X_F$
<i>HUVEC normales</i>					
<i>Con insulina</i>					
Control	2.3 \pm 0.1*	93 \pm 22	0.024 \pm 0.006*	2.0 \pm 0.5*	1.0 \pm 0.3
ZM-241385	0.9 \pm 0.4	95 \pm 59	0.010 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1 [†]
DPCPX	2.2 \pm 0.1*	88 \pm 20	0.025 \pm 0.008*	2.1 \pm 0.6*	1.0 \pm 0.3
MRS-1754	2.3 \pm 0.2*	110 \pm 29	0.021 \pm 0.007*	1.8 \pm 0.6*	0.9 \pm 0.3
MRS-1523	2.2 \pm 0.1*	88 \pm 18	0.025 \pm 0.005*	2.1 \pm 0.4*	1.0 \pm 0.2
CGS-21680	2.9 \pm 0.1*	137 \pm 20	0.021 \pm 0.003*	1.8 \pm 0.2*	0.9 \pm 0.1
CPA	2.7 \pm 0.1*	104 \pm 21	0.025 \pm 0.003*	2.1 \pm 0.2*	1.0 \pm 0.1
NECA	1.7 \pm 0.1*	95 \pm 21	0.017 \pm 0.004*	1.4 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	2.5 \pm 0.1*	84 \pm 12	0.029 \pm 0.004*	2.4 \pm 0.3*	1.2 \pm 0.2
ZM-241385	0.9 \pm 0.2	95 \pm 59	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1 [†]
CGS-21680					
DPCPX	2.2 \pm 0.1*	80 \pm 20	0.027 \pm 0.002*	2.3 \pm 0.2*	1.1 \pm 0.1
CPA					
MRS-1754	2.3 \pm 0.2*	113 \pm 29	0.020 \pm 0.002*	1.7 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1
NECA					
MRS-1523					
2Cl-IB-MECA	2.3 \pm 0.3*	89 \pm 18	0.025 \pm 0.003*	2.1 \pm 0.3*	1.0 \pm 0.1

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/^{Ins/X} F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles provenientes de embarazos normales con insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m). ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2CI-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 . * $P < 0.05$ con respecto HUVEC sin insulina. † $P < 0.05$ con respecto a Control en HUVEC normales con insulina.

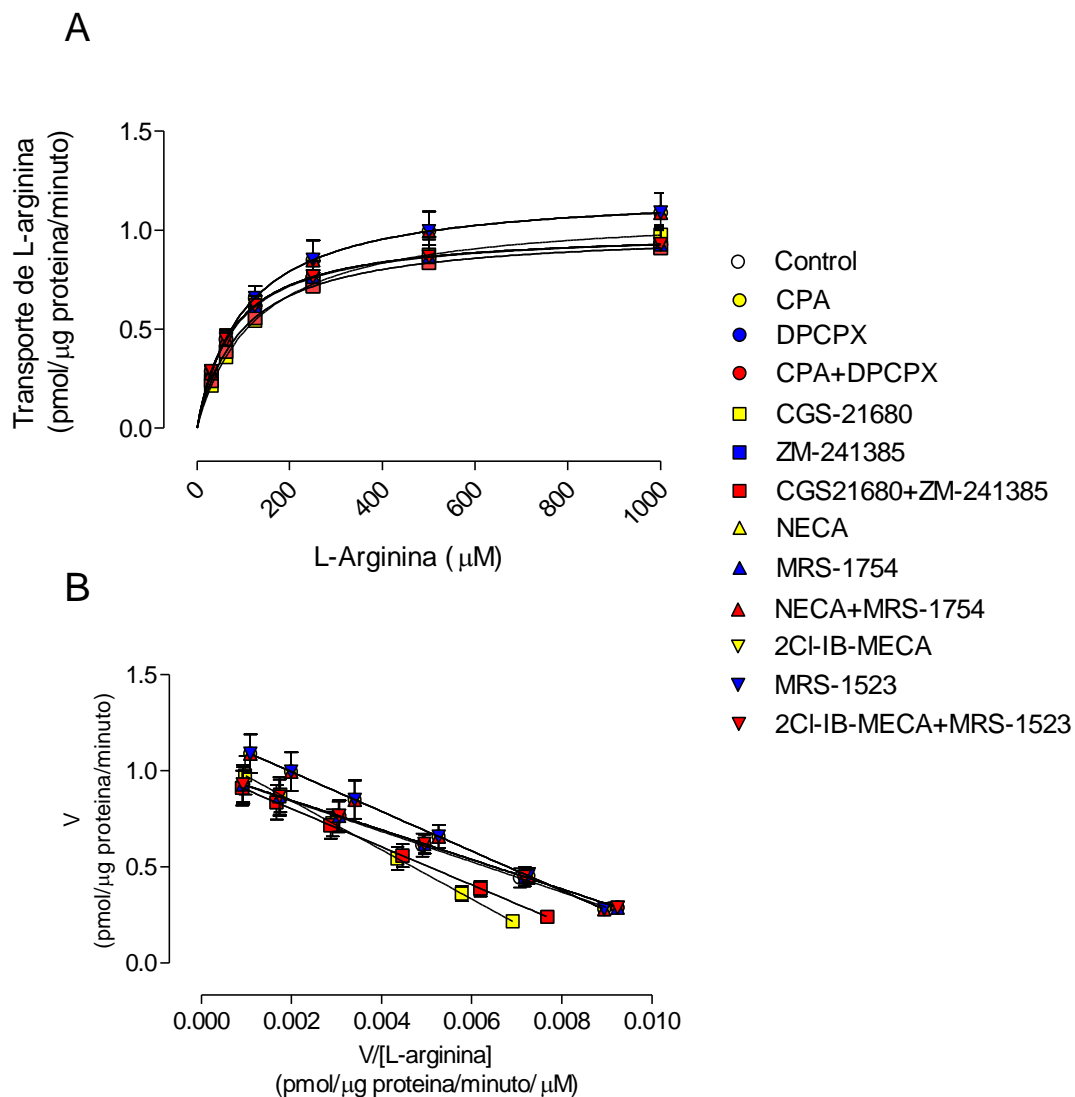


Figura 20. El transporte de L-arginina no se altera por activación de receptores de adenosina en HUVEC provenientes de embarazos normales. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μM , 3 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ L- ^3H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μM , 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas) y/o antagonistas (DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) de receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente, como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=6-12$.

A

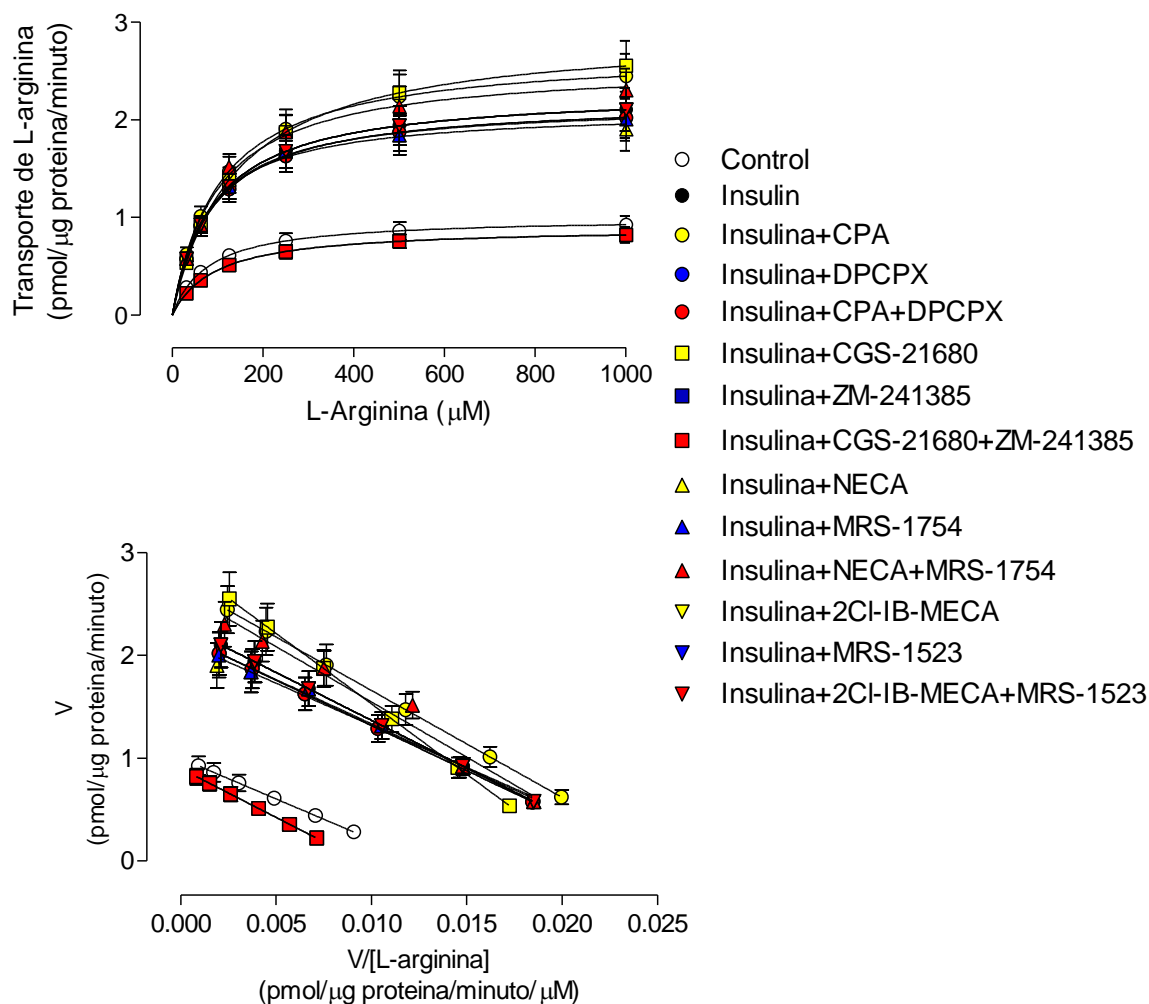


Figura 21. Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A_{2A} para aumentar el transporte saturable de L-arginina en HUVEC normales. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales en presencia de insulina (1 nM, 8 horas). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L- 3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas) y/o antagonistas (DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) de receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente, como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

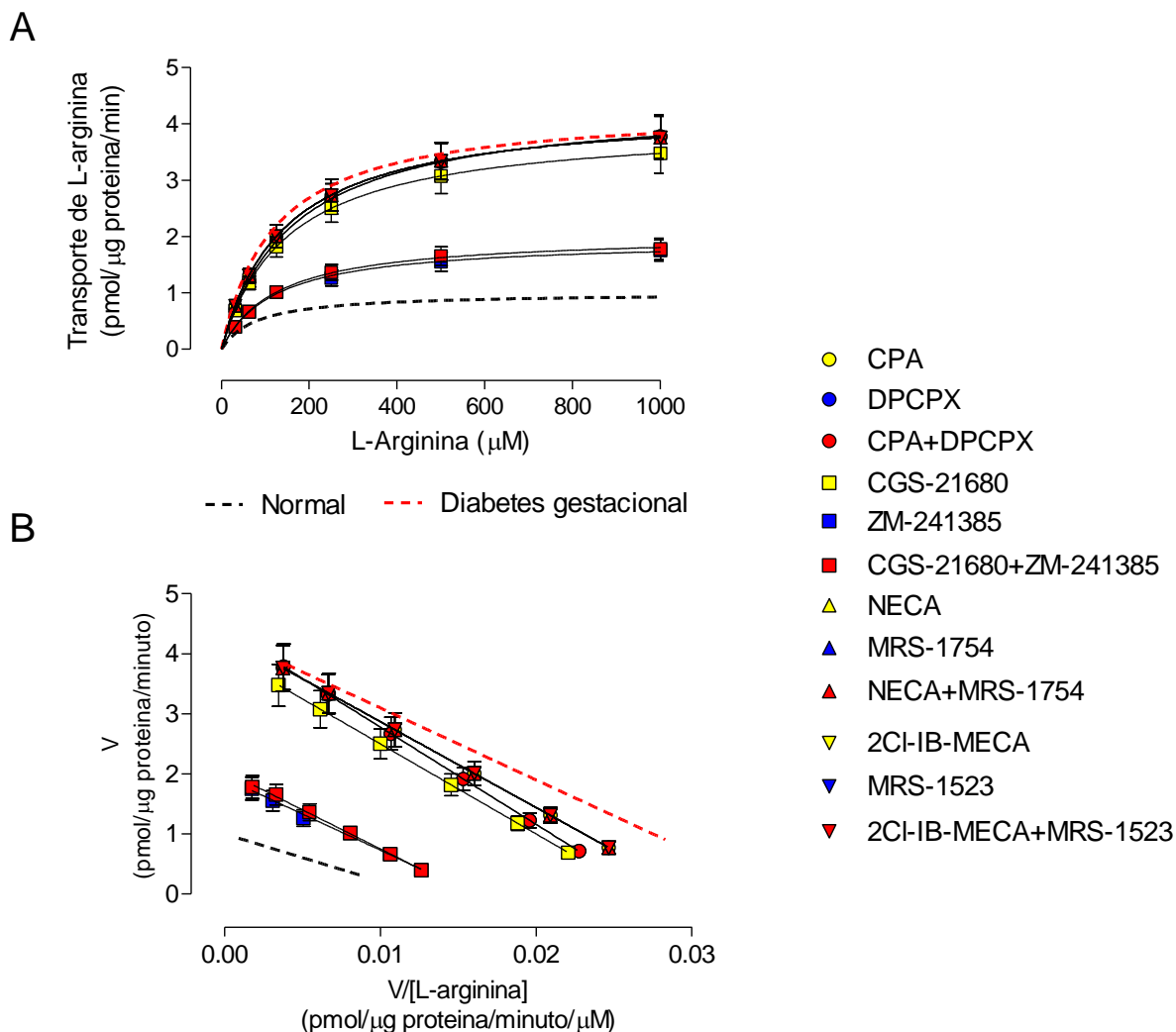


Figura 22. Diabetes gestacional aumenta el transporte de L-arginina de una manera dependiente de receptores de adenosina A_{2A} . El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 µM, 3 µCi/mL L- 3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 µM, 2CI-IB-MECA 50 nM, 8 horas) y/o antagonistas (DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) de receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente, como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

A

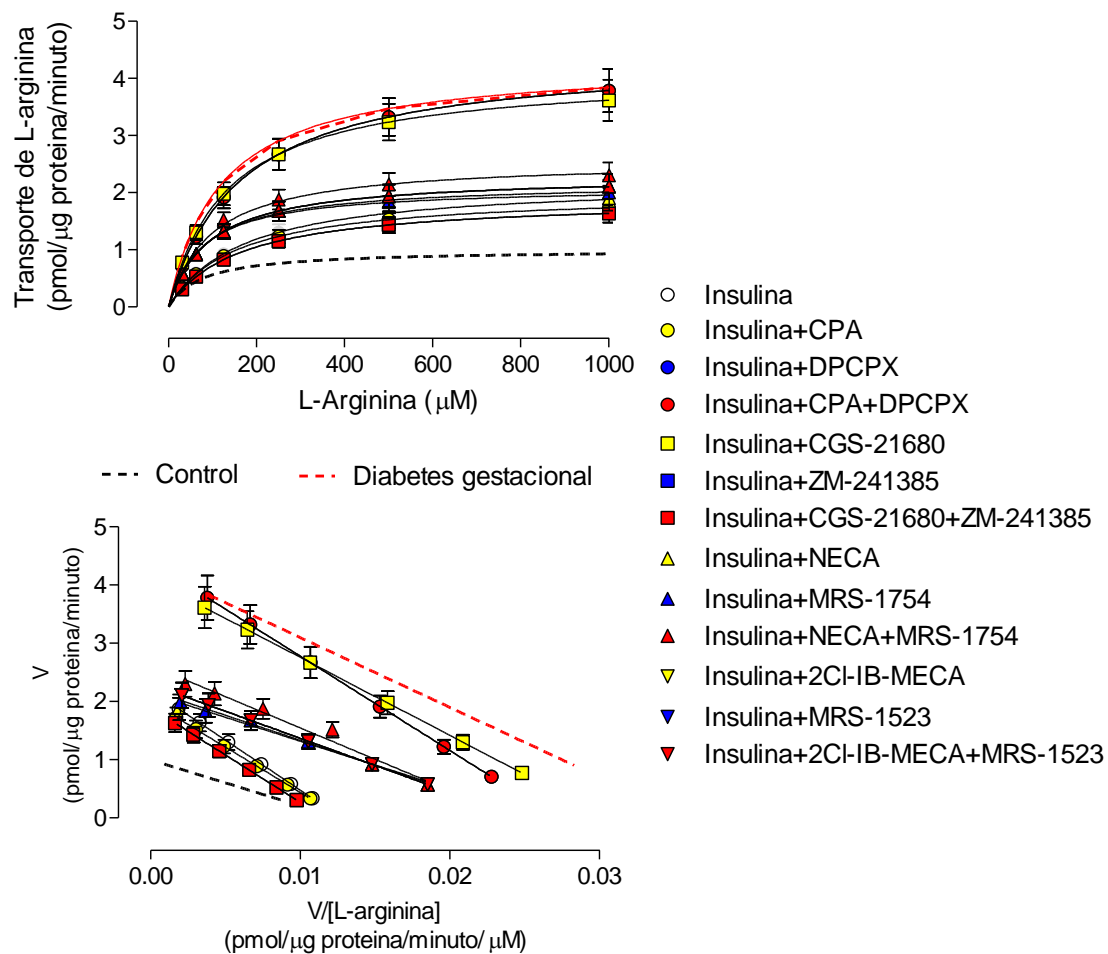


Figura 23. Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional de una manera dependiente de receptores de adenosina A_1 . El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional en presencia de insulina (1 nM, 8 horas). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L- 3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas) y/o antagonistas (DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) de receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente, como se describen en los métodos. (A) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

Tabla 9. Parametros cinéticos del transporte saturable de L-arginina por activación de receptores de adenosina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional.

Transporte saturable de L-arginina							
	V_{max} (pmol/ μ gproteína /minuto)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (pmol/ μ g proteína/ minuto/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/Ins/X_F$	$1/GD/X_F$	$1/GD-Ins/X_F$
<i>Sin insulina</i>							
<i>Normal</i>	1.0 ± 0.1	79 ± 46	0.012 ± 0.008	1.0 ± 0.6	-	0.3 ± 0.2	-
Control	$4.3 \pm 0.3^{*\dagger}$	120 ± 31	$0.035 \pm 0.011^*$	$2.9 \pm 0.9^*$	-	$1.0 \pm 0.3^*$	-
ZM-241385	$2.1 \pm 0.5^*$	135 ± 42	0.015 ± 0.008	1.3 ± 0.7	-	0.4 ± 0.2	-
DPCPX	$4.2 \pm 0.3^{*\dagger}$	125 ± 25	$0.033 \pm 0.008^*$	$2.8 \pm 0.7^*$	-	$0.9 \pm 0.2^*$	-
MRS1754	$4.1 \pm 0.3^{*\dagger}$	120 ± 34	$0.034 \pm 0.003^*$	$2.8 \pm 0.2^*$	-	$1.0 \pm 0.1^*$	-
MRS1523	$4.2 \pm 0.3^{*\dagger}$	135 ± 43	$0.031 \pm 0.003^*$	$2.6 \pm 0.3^*$	-	$0.9 \pm 0.1^*$	-
CGS-21680	$4.0 \pm 0.3^{*\dagger}$	150 ± 35	$0.026 \pm 0.002^*$	$2.2 \pm 0.2^*$	-	$0.7 \pm 0.1^*$	-
CPA	$4.3 \pm 0.3^{*\dagger}$	143 ± 33	$0.030 \pm 0.003^*$	$2.5 \pm 0.3^*$	-	$0.9 \pm 0.1^*$	-
NECA	$4.3 \pm 0.3^{*\dagger}$	134 ± 34	$0.032 \pm 0.003^*$	$2.7 \pm 0.3^*$	-	$0.9 \pm 0.1^*$	-
2CI-IB-MECA	$4.1 \pm 0.3^{*\dagger}$	142 ± 53	$0.028 \pm 0.003^*$	$2.3 \pm 0.2^*$	-	$0.9 \pm 0.1^*$	-
ZM-241385	$2.0 \pm 0.2^*$	135 ± 42	0.014 ± 0.001	1.2 ± 0.1	-	0.4 ± 0.1	-
CGS-21680							
DPCPX							
CPA	$4.1 \pm 0.3^{*\dagger}$	125 ± 25	$0.033 \pm 0.003^*$	$2.8 \pm 0.3^*$	-	$0.9 \pm 0.1^*$	-
MRS-1754							
NECA	$4.3 \pm 0.3^{*\dagger}$	120 ± 34	$0.035 \pm 0.004^*$	$2.9 \pm 0.3^*$	-	$1.0 \pm 0.1^*$	-
MRS-1523							
2CI-IB-MECA	$4.0 \pm 0.3^{*\dagger}$	135 ± 43	$0.029 \pm 0.003^*$	$2.4 \pm 0.2^*$	-	$0.8 \pm 0.1^*$	-

La tabla continúa en la próxima página.

<i>Continuación</i>	V_{\max} (pmol/ μ g protein/minute)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g protein/minute/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/Ins^X_F$	$1/GD^X_F$	$1/GD-Ins^X_F$
HUVEC con diabetes gestacional							
<i>Con insulina</i>							
Control	2.2 \pm 0.5*‡	172 \pm 40	0.012 \pm 0.005‡	1.0 \pm 0.4‡	-	0.3 \pm 0.1‡	1.0 \pm 0.4
ZM-241385	1.9 \pm 0.4*‡	163 \pm 95	0.011 \pm 0.009‡	0.9 \pm 0.7‡	-	0.3 \pm 0.1‡	0.9 \pm 0.1
DPCPX	4.4 \pm 0.3*	162 \pm 46	0.027 \pm 0.008*	2.3 \pm 0.6*	-	0.8 \pm 0.1*	2.3 \pm 0.2#
MRS1754	3.0 \pm 0.3*‡	173 \pm 72	0.017 \pm 0.002‡	1.4 \pm 0.2‡	-	0.5 \pm 0.1‡	1.4 \pm 0.1
MRS1523	2.3 \pm 0.2*‡	163 \pm 53	0.014 \pm 0.001‡	1.2 \pm 0.1‡	-	0.4 \pm 0.1‡	1.2 \pm 0.1
CGS-21680	4.1 \pm 0.3*‡	134 \pm 31	0.031 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.2*	-	0.9 \pm 0.1*	2.6 \pm 0.2#
CPA	2.2 \pm 0.4*‡	156 \pm 35	0.013 \pm 0.001‡	1.1 \pm 0.1‡	-	0.4 \pm 0.1‡	1.1 \pm 0.1
NECA	2.2 \pm 0.2*‡	142 \pm 35	0.015 \pm 0.002‡	1.3 \pm 0.1‡	-	0.5 \pm 0.1‡	1.3 \pm 0.1
2CI-IB-MECA	2.3 \pm 0.2*‡	162 \pm 34	0.014 \pm 0.001‡	1.2 \pm 0.1‡	-	0.4 \pm 0.1‡	1.2 \pm 0.1
ZM-241385	1.8 \pm 0.4*‡	163 \pm 95	0.011 \pm 0.001‡	0.9 \pm 0.1‡	-	0.3 \pm 0.1‡	0.9 \pm 0.1
CGS-21680							
DPCPX	4.5 \pm 0.3*	162 \pm 46	0.028 \pm 0.003*	2.3 \pm 0.2*	-	0.8 \pm 0.1*	2.3 \pm 0.2#
CPA							
MRS-1754	2.9 \pm 0.3*‡	173 \pm 72	0.018 \pm 0.002‡	1.5 \pm 0.2‡	-	0.5 \pm 0.1‡	1.5 \pm 0.1
NECA							
MRS-1523	2.3 \pm 0.2*‡	163 \pm 53	0.014 \pm 0.001‡	1.2 \pm 0.2‡	-	0.4 \pm 0.1‡	1.2 \pm 0.1
2CI-IB-MECA							

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional (DG) en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{max}/K_m); $1/DG^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles provenientes de embarazos con diabetes gestacional sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte. $1/DG-Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles provenientes de embarazos con diabetes gestacional con insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2CI-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 . * $P < 0.05$ con respecto a control *Normal*. † $P < 0.05$ con respecto a HUVEC con DG sin insulina en presencia de ZM-241385. ‡ $P < 0.05$ con respecto a HUVEC con DG en presencia de insulina y de DPCPX. # $P < 0.05$ con respecto al resto de los valores en $1/GD-Ins^X F$.

5.17 Participación de IR-A e IR-B en el efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre la captación de L-arginina en HUVEC.

Como se mostró anteriormente, en HUVEC provenientes de embarazos normales no cambiaron la captación de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina (ver Figura 18A). Estas captaciones de L-arginina no fueron modificadas en presencia de siRNA para las isoformas de los receptores de insulina A (IR-A) y B (IR-B) (Figuras 24A, 25A, 26A y 27A).

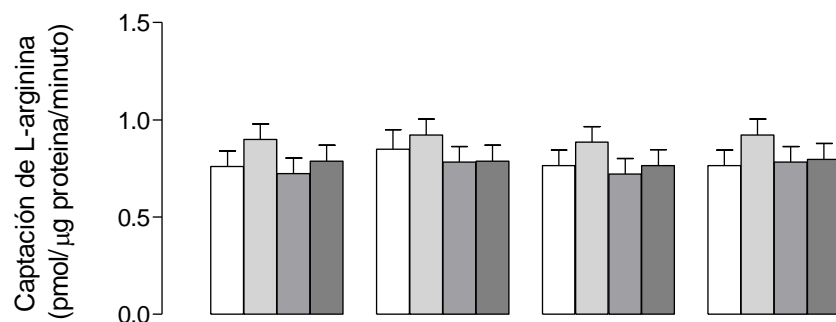
De manera interesante, insulina aumenta la captación de L-arginina en HUVEC normales, efecto que sólo fue bloqueado al incubar estas células con ZM-241385 (antagonista de receptores de adenosina A_{2A}) (ver Figura 18B). El efecto de ZM-241385 no fue modificado en células *knock-down* para IR-A e IR-B (Figura 25B).

Los agonistas de los receptores de adenosina A_1 , A_{2B} y A_3 no generan cambios en la captación de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales en presencia de insulina (ver Figura 18A). Al realizar los mismos ensayos en células *knock-down* para IR-A e IR-B, no se observaron cambios (Figuras 24B, 26B y 27B).

Por otro lado, células HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional muestran una mayor captación de L-arginina con respecto a células normales. El efecto de diabetes gestacional sólo fue bloqueado parcialmente al usar ZM-241385 (ver Figura 19A). Este efecto observado en estas células por este antagonista no fue modificado en presencia de los siRNA para IR-A e IR-B (Figura 29A).

El efecto de diabetes gestacional sobre la captación de L-arginina no fue modificado por los receptores de adenosina A_1 , A_{2B} y A_3 (ver Figura 19A), el cual no fue alterado en presencia de los siRNA para IR-A e IR-B (Figuras 28A, 30A y 31A).

A



B

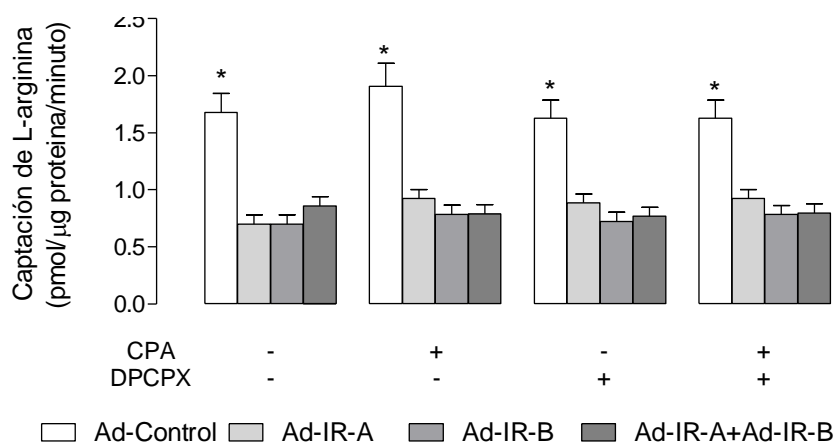
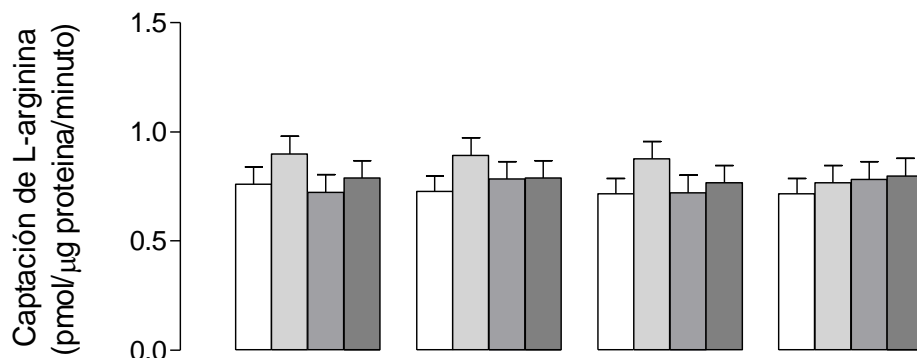


Figura 24. Insulina requiere de IR-A e IR-B, pero no de receptores de adenosina A₁ para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales. Células provenientes de embarazos normales fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonista (CPA, 30 nM, 8 horas), y antagonista (DPCPX, 30 nM, 8 horas) del receptor de adenosina A₁ en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12. * P <0.05 con respecto a todos los valores observados en A, y a las células incubadas con insulina en presencia de Ad-IR-A y/o Ad-IR-B.

A



B

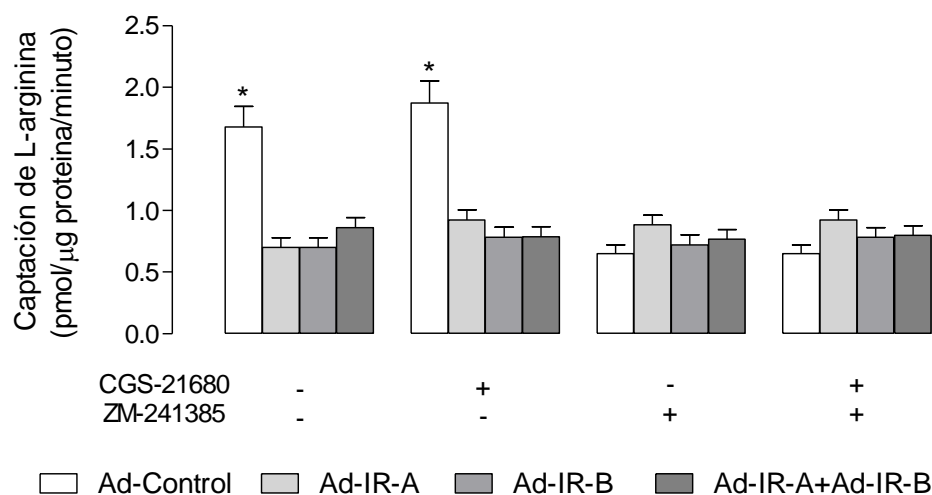


Figura 25. Insulina requiere de IR-A e IR-B, y de receptores de adenosina A_{2A} para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales. Células provenientes de embarazos normales fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L- 3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonista (CGS-21680, 30 nM, 8 horas), y antagonista (ZM-241385, 10 nM, 8 horas) del receptor de adenosina A_{2A} en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12. * P <0.05 con respecto a todos los valores observados en A, y a las células incubadas con insulina en presencia de Ad-Control en presencia de ZM-241385, y en presencia de Ad-IR-A y/o Ad-IR-B.

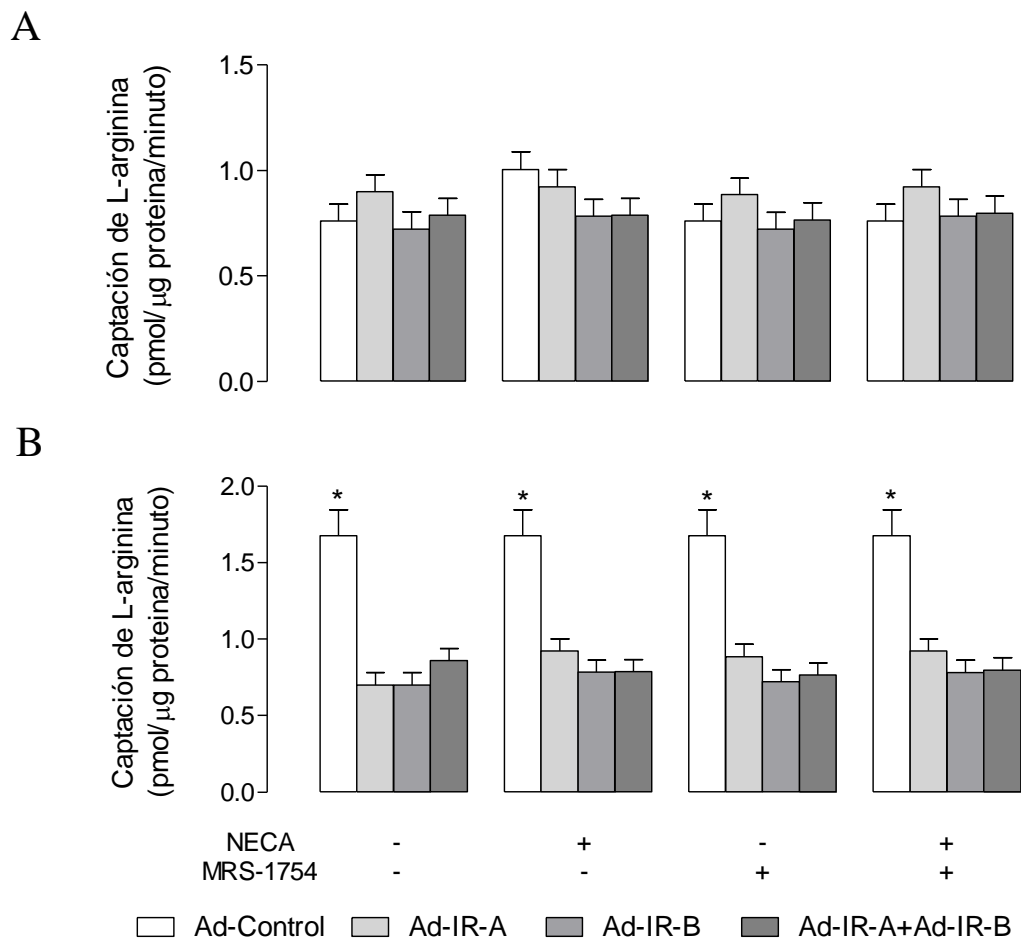


Figura 26. Insulina requiere de IR-A e IR-B, pero no de receptores de adenosina A_{2B} para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales. Células provenientes de embarazos normales fueron incubadas con $300 \mu\text{M}$ de L-arginina ($3 \mu\text{Ci/mL}$ L- ^3H arginina, 37°C , 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM , 8 horas), agonista (NECA, $1 \mu\text{M}$, 8 horas), y antagonista (MRS-1754, 30 nM , 8 horas) del receptor de adenosina A_{2B} en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=6-12$. $*P<0.05$ con respecto a todos los valores observados en A, y a las células incubadas con insulina en presencia de Ad-IR-A y/o Ad-IR-B.

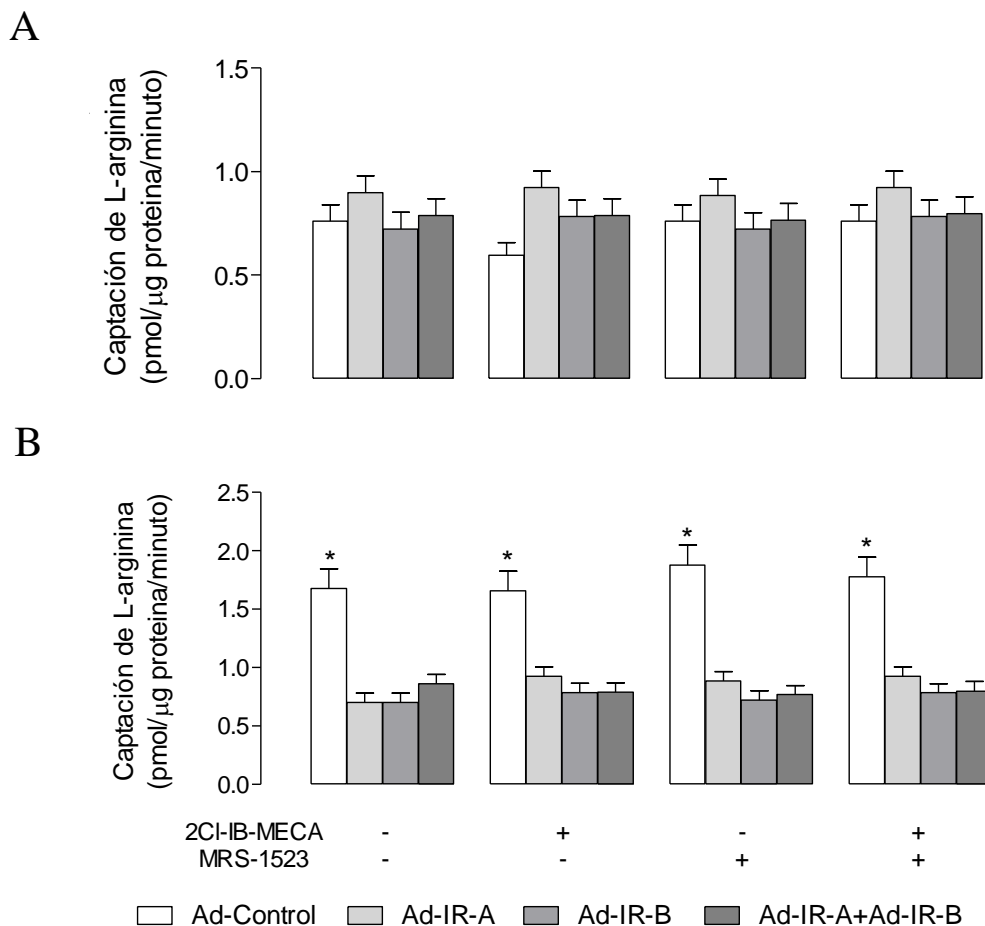


Figura 27. Insulina requiere de IR-A e IR-B, pero no de receptores de adenosina A_3 para aumentar la captación de L-arginina en HUVEC normales. Células provenientes de embarazos normales fueron incubadas con $300 \mu\text{M}$ de L-arginina ($3 \mu\text{Ci/mL}$ L- ^3H]arginina, 37°C , 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM , 8 horas), agonista (2-Cl-IB-MECA, 30 nM , 8 horas), y antagonista (MRS-1523, 30 nM , 8 horas) del receptor de adenosina A_3 en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., $n=6-12$. $*P<0.05$ con respecto a todos los valores observados en A, y a las células incubadas con insulina en presencia de Ad-IR-A y/o Ad-IR-B.

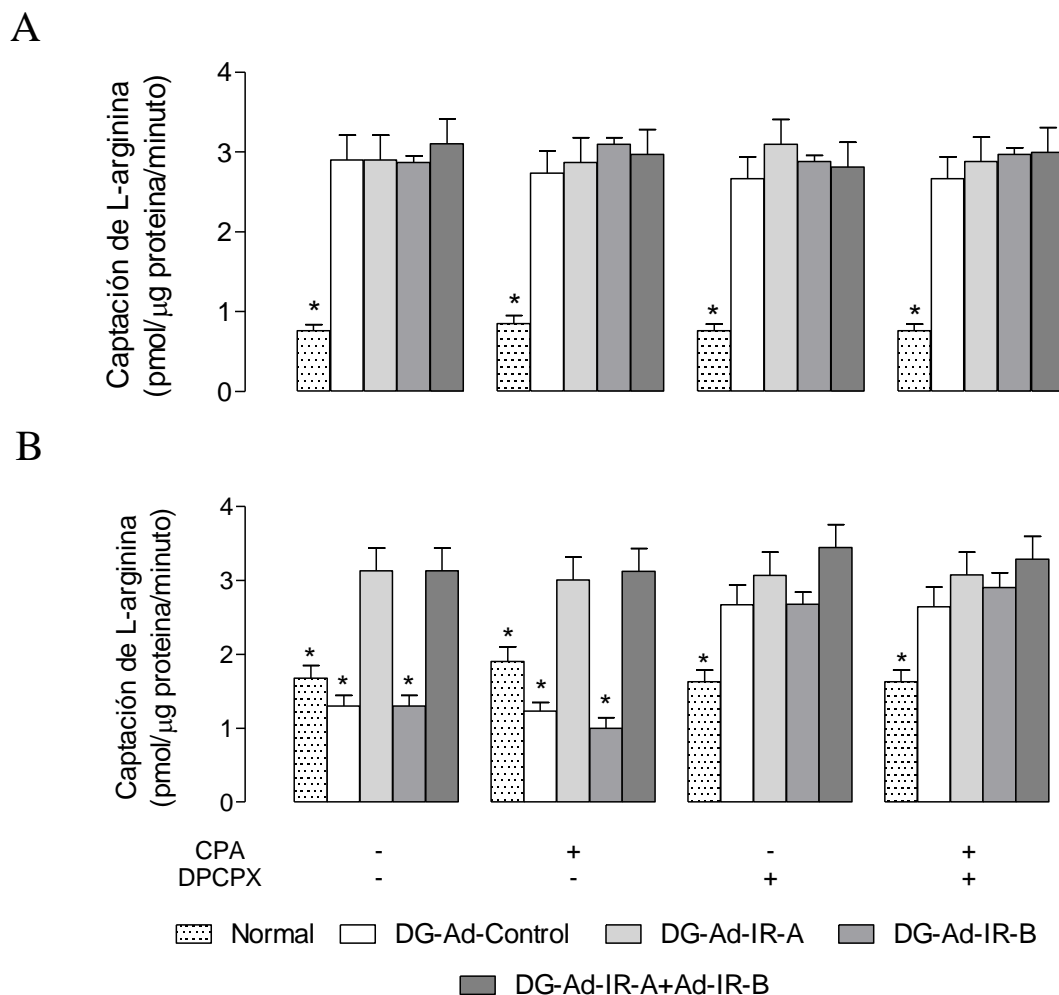
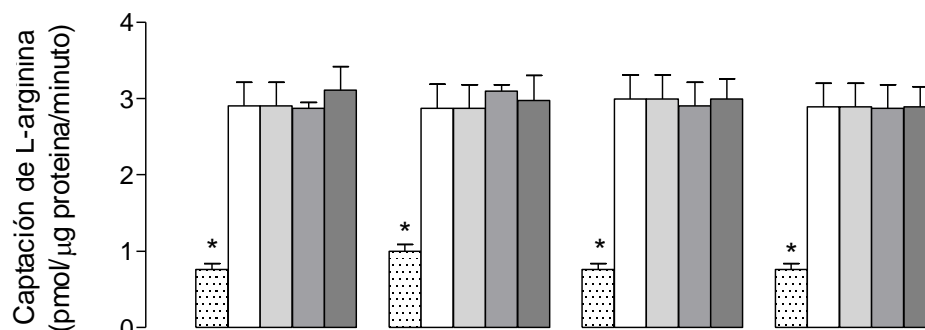


Figura 28. Insulina requiere de IR-A y de receptores de adenosina A_1 para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos con diabetes gestacional fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonista (CPA, 30 nM, 8 horas), y antagonista (DPCPX, 30 nM, 8 horas) del receptor de adenosina A_1 en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12. En A, * P <0.05 con respecto á las células en presencia de Ad-IR-A y/o Ad-IR-B. En B, * P <0.05 con respecto a células con Ad-IR-A, Ad-IR-B en presencia de DPCPX, y Ad-IR-A+Ad-IR-B.

A



B

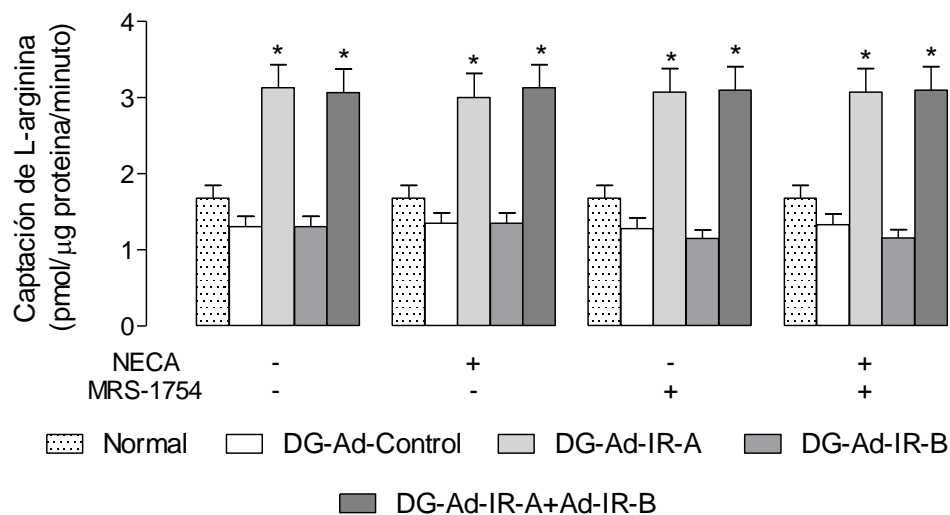


Figura 30. Insulina requiere de IR-A y no de receptores de adenosina A_{2B} para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos con diabetes gestacional fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonista (NECA, 1 μ M, 8 horas), y antagonista (MRS1754, 30 nM, 8 horas) del receptor de adenosina A_{2B} en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12. En A, * P <0.05 con respecto al resto de los valores en presencia de Ad-Control, Ad-IR-A y Ad-IR-B. En B, * P <0.05 con respecto a células normales (Normal) y con DG con Ad-Control y Ad-IR-B.

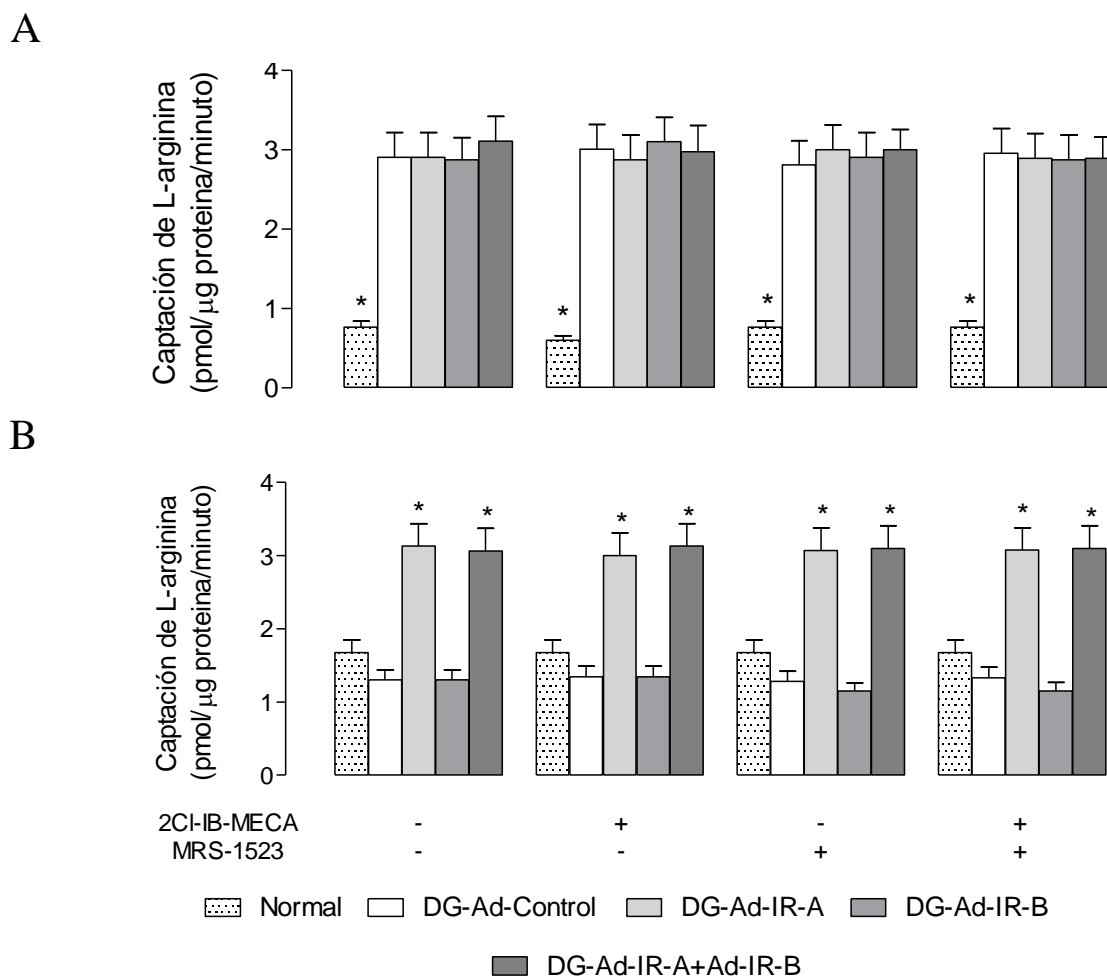


Figura 31. Insulina requiere de IR-A y no de receptores de adenosina A₃ para revertir el aumento de la captación de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos con diabetes gestacional fueron incubadas con 300 μ M de L-arginina (3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia (A) y presencia (B) de insulina (1 nM, 8 horas), agonista (2-Cl-IB-MECA, 30 nM, 8 horas), y antagonista (MRS-1523, 30 nM, 8 horas) del receptor de adenosina A₃ en células *knock-down* para las isoformas del receptor de insulina A (Ad-IR-A) y B (Ad-IR-B). La radioactividad asociada a las células fue determinada como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12. En A, * P <0.05 con respecto al resto de los valores en presencia de Ad-Control, Ad-IR-A y Ad-IR-B. En B, * P <0.05 con respecto a células normales (Normal) y con DG con Ad-Control y Ad-IR-B.

Cuando las HUVEC de diabetes gestacional son incubadas en presencia de insulina, la captación de L-arginina vuelve a valores observados en células normales en ausencia de insulina. Este efecto de insulina fue bloqueado al utilizar un antagonista de receptores de adenosina A₁ (DPCPX) y el agonista del receptor de adenosina A_{2A} (CGS-21680) (ver Figura 19B). Este efecto fue bloqueado sólo en las células *knock-down* para IR-A (Figuras 28B, 29B).

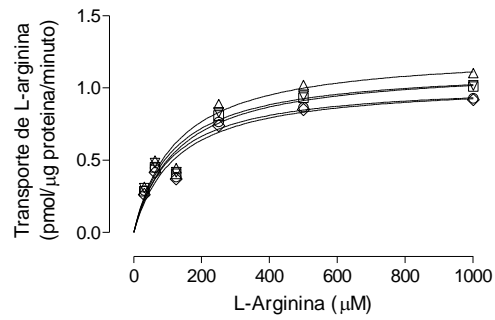
El efecto de insulina en células HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional no fue modificado por por agonistas y/o antagonistas de receptores A_{2B} y A₃ (ver Figura 19B). La captación de L-arginina en estas condiciones no fue modificado en presencia de los siRNA para IR-A e IR-B (Figuras 30B, 31B).

5.18 Participación de IR-A e IR-B en el efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC normales.

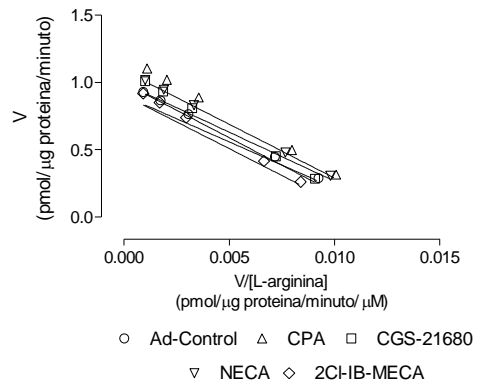
Como ya se ha indicado, en HUVEC provenientes de embarazos normales no cambiaron los parámetros cinéticos (V_{\max} , K_m , V_{\max}/K_m) del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina (ver Figura 20A). El transporte de L-arginina saturable no fue modificado en presencia de siRNA para las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina (Figuras 32A, C, E; 34A, C, D; y 36A, C, D; Tablas 10, 11 y 12). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figuras 32B/D/F; 34B/D/F; 36B/D/F).

Por otro lado, insulina aumenta la V_{\max} y la V_{\max}/K_m del transporte saturable de L-arginina en células HUVEC normales transfectadas con un siRNA control (Ad-control), sin modificarse por agonistas y antagonistas de receptores de adenosina A₁, A_{2B} y A₃; sin

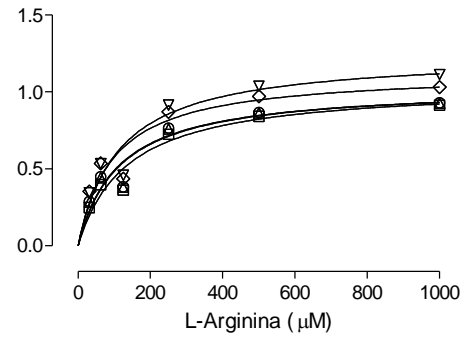
A



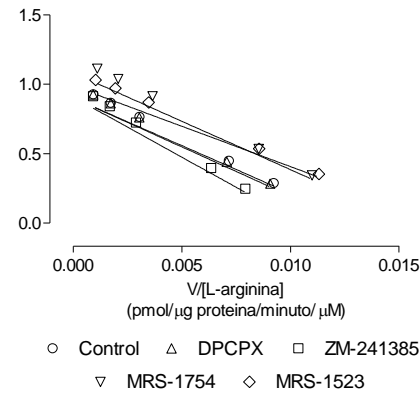
B



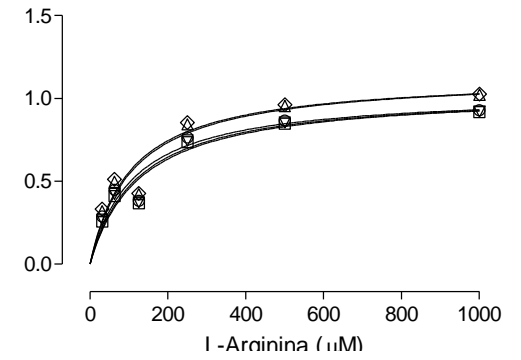
C



D



E



F

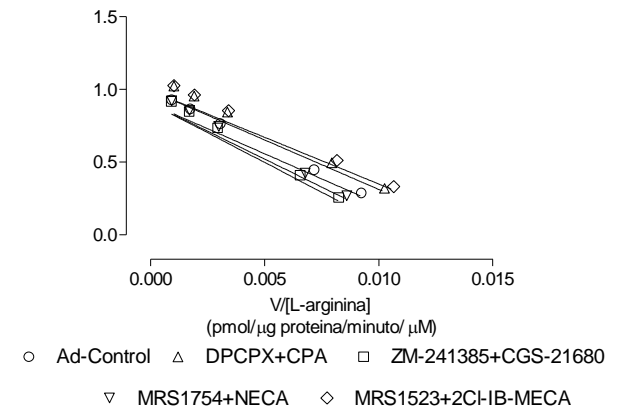
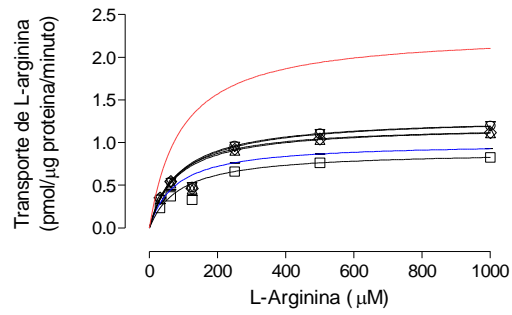


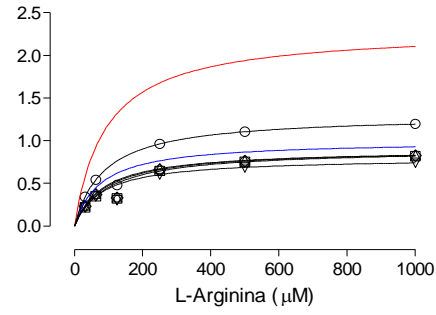
Figura 32 continúa en la siguiente página

Figura 32. El transporte de L-arginina no se altera en HUVEC normales *knockdown* para IR-A en presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina.. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, como se describen en los métodos. (A, C, E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B, D, F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

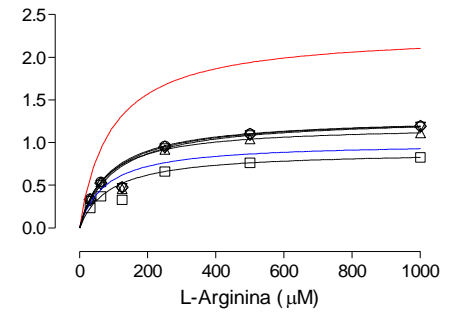
A



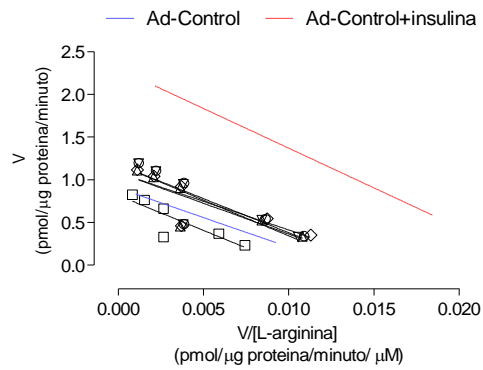
C



E

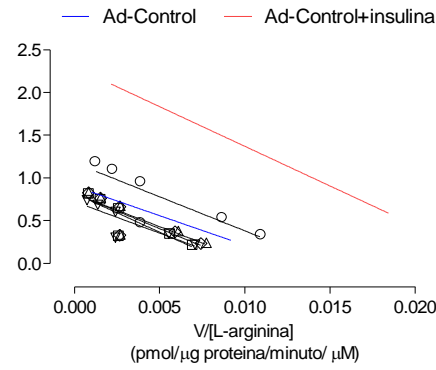


B



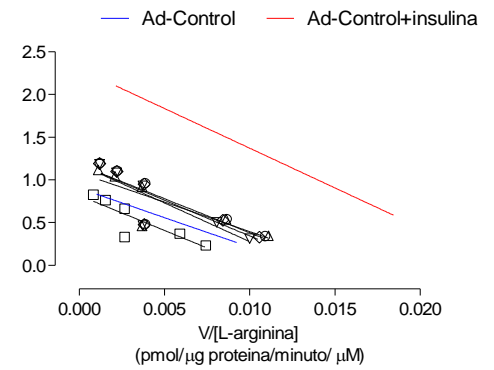
○ insulina △ DPCPX+insulina □ ZM-241385+insulina
 ▽ MRS-1754+insulina ◇ MRS-1523+insulina

D



○ insulina △ CPA+insulina □ CGS-21680+insulina
 ▽ NECA+insulina ◇ 2CI-IB-MECA+insulina

F

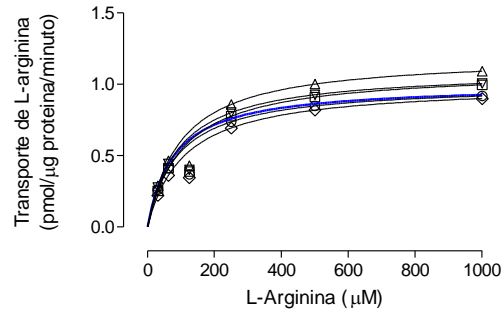


○ insulina △ DPCPX+CPA+insulina □ ZM-241385+CGS-21680+insulina
 ▽ MRS1754+NECA+insulina ◇ MRS1523+2CI-IB-MECA+insulina

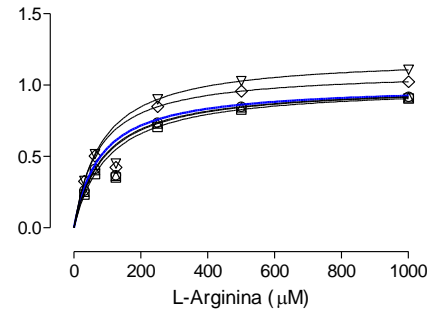
Figura 33 continúa en la siguiente página

Figura 33. Insulina no aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC normales *knockdown* para IR-A en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μM , 3 $\mu\text{Ci/mL}$ L- ^3H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μM , 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, en presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A,C,E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B,D,F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

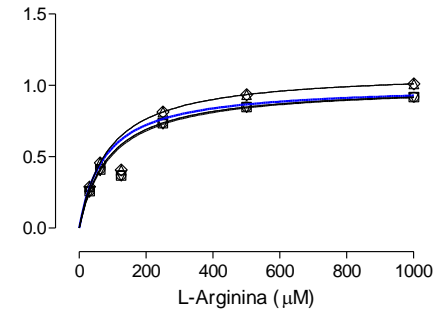
A



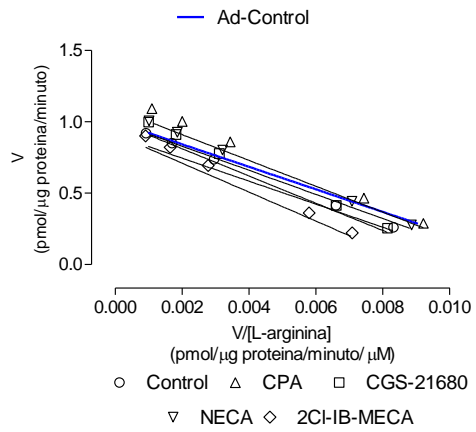
C



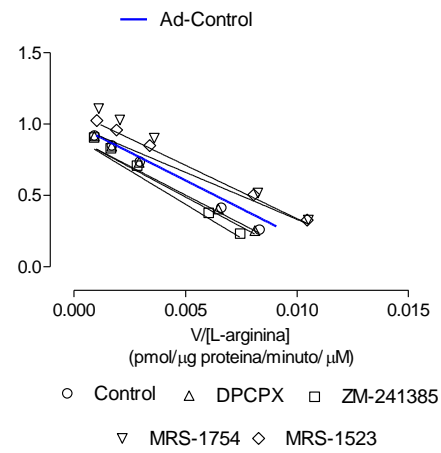
E



B



D



F

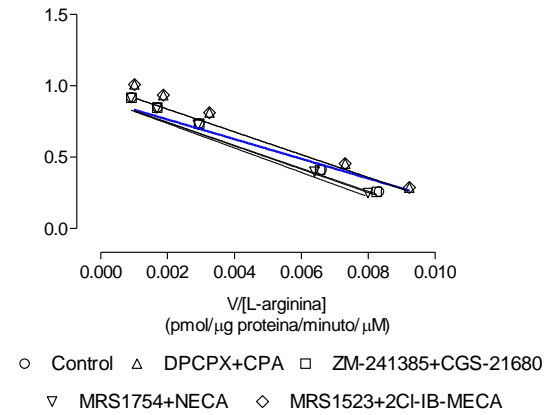


Figura 34 continúa en la siguiente página

Figura 34. El transporte de L-arginina no se altera en HUVEC normales *knockdown* para IR-B en presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, como se describen en los métodos. (A, C, E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B, D, F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

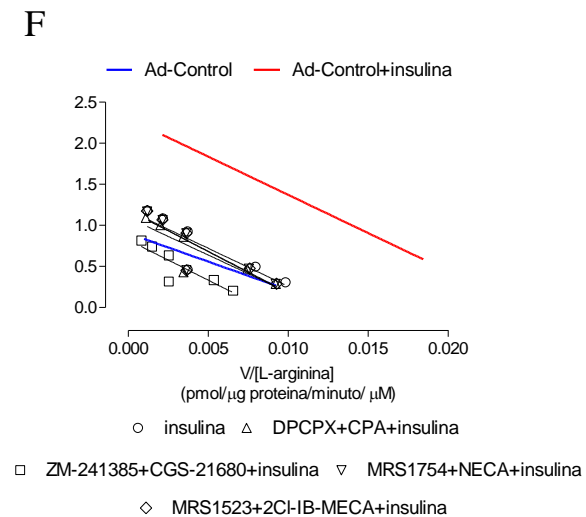
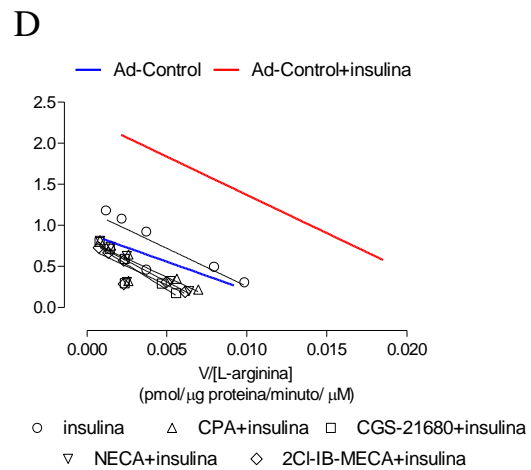
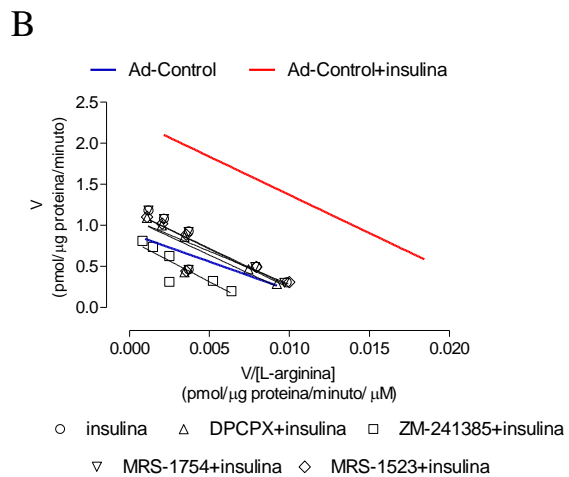
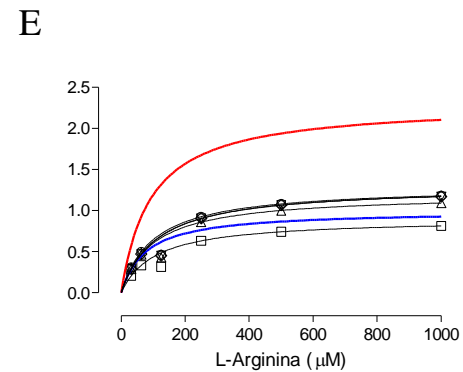
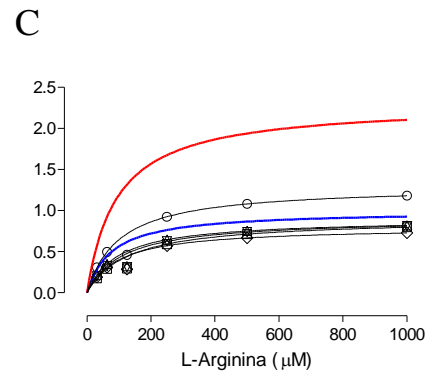
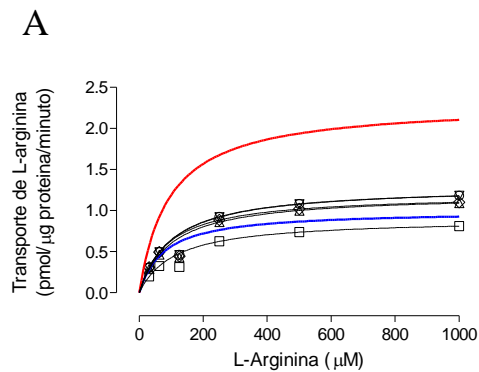


Figura 35 continúa en la página 112

Figura 35. Insulina no aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC normales knockdown para IR-B en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2CI-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, en presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A,C,E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B,D,F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

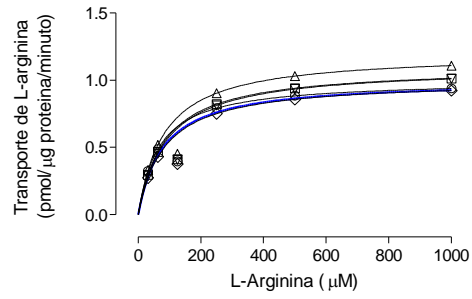
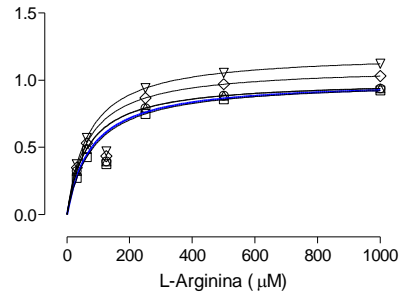
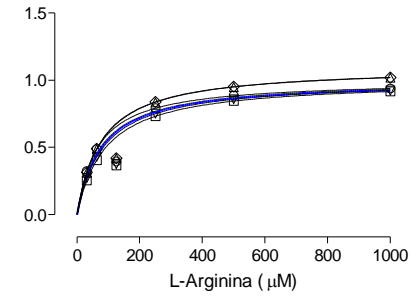
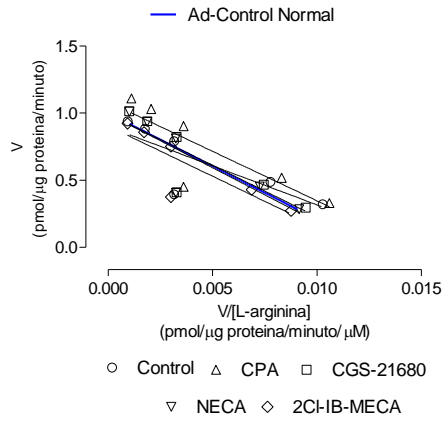
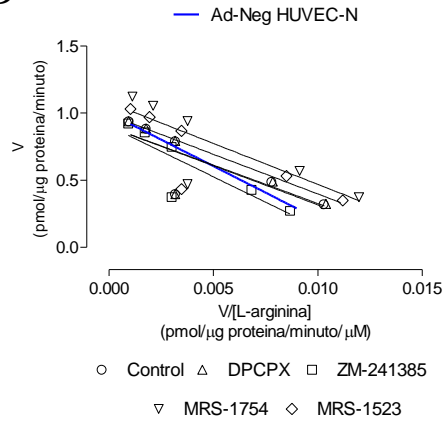
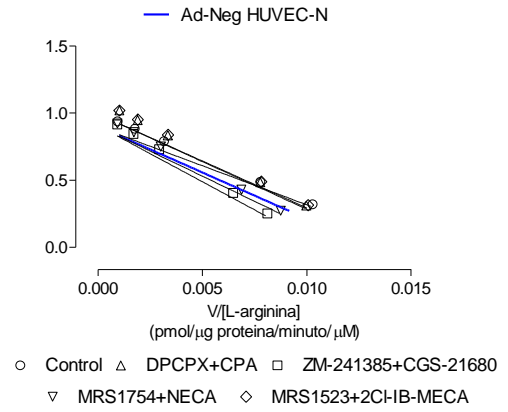
A**C****E****B****D****F***Figura 36 continúa en la página 114*

Figura 36. HUVEC normales *knockdown* para IR-A e IR-B en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina no cambian el transporte de L-arginina. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L- 3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, como se describen en los métodos. (A,C,E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B,D,F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

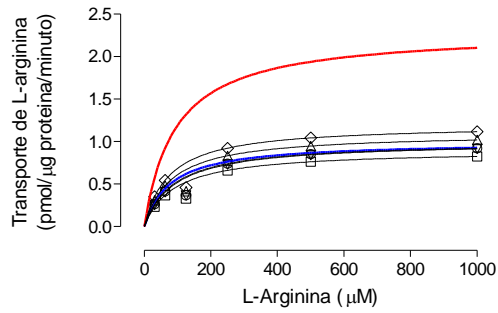
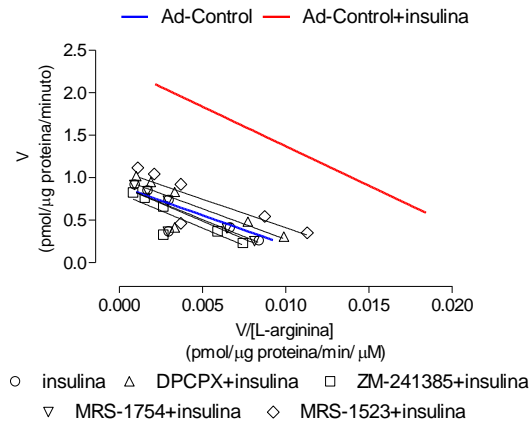
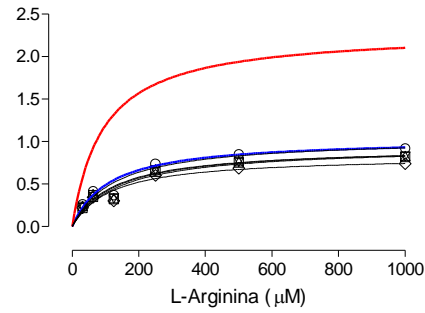
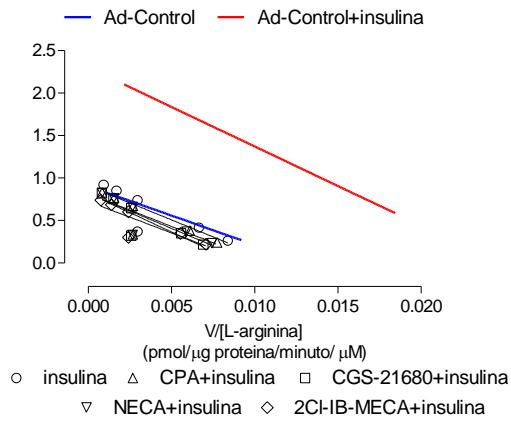
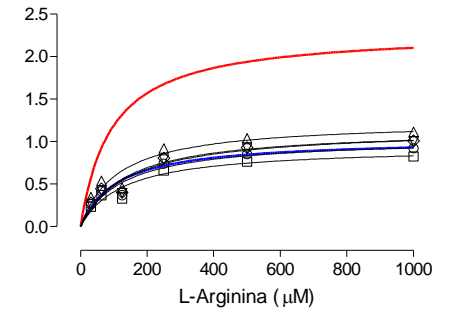
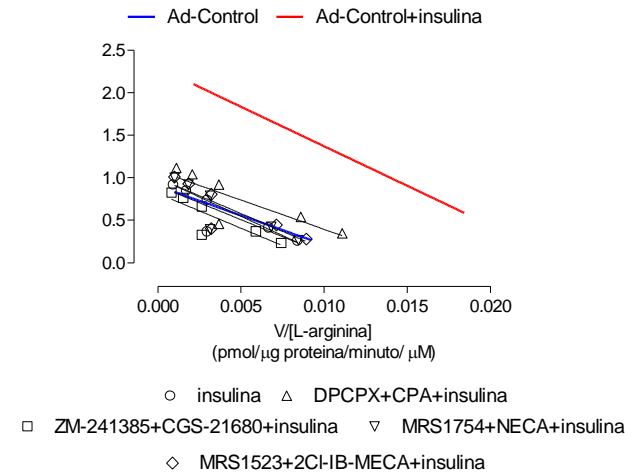
A**B****C****D****E****F***Figura 37 continúa en la página 116*

Figura 37. Insulina no aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC normales *knockdown* para IR-A e IR-B en ausencia y presencia de agonistas y antagonistas de receptores de adenosina. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos normales *knock-down* para las isoformas A y B del receptor de insulina (IR-A+IR-B). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[3 H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, en presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A, C, E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B, D, F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

Tabla 10. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC normales *knock-down* para IR-A.

Transporte de L-arginina					
	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/Ins^X_F$
<i>Sin insulina</i>					
<i>Normal</i>	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
Control	1.0 \pm 0.1	77 \pm 44	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
ZM-241385	1.0 \pm 0.1	95 \pm 33	0.010 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	-
DPCPX	1.0 \pm 0.1	79 \pm 45	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
MRS-1754	1.2 \pm 0.1	78 \pm 32	0.015 \pm 0.002	1.3 \pm 0.1	-
MRS-1523	1.1 \pm 0.1	66 \pm 38	0.016 \pm 0.003	1.3 \pm 0.1	-
CGS-21680	1.1 \pm 0.2	90 \pm 44	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
CPA	1.2 \pm 0.1	88 \pm 45	0.013 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	-
NECA	1.1 \pm 0.1	81 \pm 32	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
2CI-IB-MECA	1.0 \pm 0.1	88 \pm 22	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
ZM-241385	1.0 \pm 0.1	90 \pm 33	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
CGS-21680	1.0 \pm 0.1	90 \pm 33	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
DPCPX	1.1 \pm 0.1	76 \pm 40	0.014 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	-
CPA	1.1 \pm 0.1	76 \pm 40	0.014 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	-
MRS-1754	1.0 \pm 0.1	85 \pm 16	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
NECA	1.0 \pm 0.1	85 \pm 16	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
MRS-1523	1.1 \pm 0.1	72 \pm 21	0.015 \pm 0.003	1.3 \pm 0.1	-
2CI-IB-MECA	1.1 \pm 0.1	72 \pm 21	0.015 \pm 0.003	1.3 \pm 0.1	-

La tabla continúa en la próxima página.

<i>Continuación</i>	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/Ins/X_F$
<i>Con insulina</i>					
Control	1.3 \pm 0.1	88 \pm 42	0.014 \pm 0.002	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	90 \pm 49	0.010 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
DPCPX	1.2 \pm 0.1	80 \pm 45	0.015 \pm 0.003	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
MRS-1754	1.3 \pm 0.1	92 \pm 46	0.014 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
MRS-1523	1.2 \pm 0.1	75 \pm 29	0.016 \pm 0.003	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
CGS-21680	0.9 \pm 0.1	99 \pm 34	0.009 \pm 0.001	1.8 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1
CPA	0.9 \pm 0.1	85 \pm 52	0.010 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
NECA	0.9 \pm 0.1	90 \pm 42	0.010 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	0.8 \pm 0.1	82 \pm 33	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	90 \pm 59	0.010 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
CGS-21680					
DPCPX	1.2 \pm 0.1	77 \pm 45	0.015 \pm 0.003	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
CPA					
MRS-1754	1.3 \pm 0.1	99 \pm 49	0.013 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
NECA					
MRS-1523	1.3 \pm 0.1	92 \pm 45	0.014 \pm 0.003	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA					

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional (DG) en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles en presencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2Cl-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 .

Tabla 11. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC normales *knock-down* para IR-B.

Transporte de L-arginina					
	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/Ins^X_F$
<i>Sin insulina</i>					
<i>Normal</i>	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
Control	1.0 \pm 0.1	89 \pm 44	0.011 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
ZM-241385	1.0 \pm 0.1	103 \pm 33	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	-
DPCPX	1.0 \pm 0.1	92 \pm 45	0.010 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
MRS-1754	1.2 \pm 0.1	83 \pm 32	0.014 \pm 0.002	1.3 \pm 0.1	-
MRS-1523	1.1 \pm 0.1	74 \pm 38	0.014 \pm 0.002	1.3 \pm 0.1	-
CGS-21680	1.1 \pm 0.2	104 \pm 44	0.011 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
CPA	1.2 \pm 0.1	99 \pm 45	0.012 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	-
NECA	1.1 \pm 0.1	93 \pm 32	0.012 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	-
2Cl-IB-MECA	1.0 \pm 0.1	110 \pm 22	0.009 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	-
ZM-241385	1.0 \pm 0.1	107 \pm 33	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	-
CGS-21680	1.0 \pm 0.1	107 \pm 33	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	-
DPCPX	1.1 \pm 0.1	88 \pm 40	0.013 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	-
CPA	1.1 \pm 0.1	88 \pm 40	0.013 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	-
MRS-1754	1.0 \pm 0.1	94 \pm 16	0.011 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
NECA	1.0 \pm 0.1	94 \pm 16	0.011 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	-
MRS-1523	1.1 \pm 0.1	88 \pm 21	0.013 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	-
2Cl-IB-MECA	1.1 \pm 0.1	88 \pm 21	0.013 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	-

La tabla continúa en la próxima página.

<i>Continuación</i>	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/^{Ins}_X_F$
<i>Con insulina</i>					
Control	1.3 \pm 0.1	101 \pm 42	0.013 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	110 \pm 49	0.008 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
DPCPX	1.2 \pm 0.1	99 \pm 45	0.012 \pm 0.002	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
MRS-1754	1.3 \pm 0.1	103 \pm 46	0.012 \pm 0.002	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
MRS-1523	1.2 \pm 0.1	89 \pm 29	0.013 \pm 0.002	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
CGS-21680	0.9 \pm 0.1	130 \pm 34	0.007 \pm 0.001	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
CPA	0.9 \pm 0.1	98 \pm 52	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
NECA	0.9 \pm 0.1	110 \pm 42	0.008 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	0.8 \pm 0.1	99 \pm 33	0.008 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	106 \pm 59	0.008 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
CGS-21680					
DPCPX	1.2 \pm 0.1	99 \pm 45	0.012 \pm 0.002	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
CPA					
MRS-1754	1.3 \pm 0.1	110 \pm 49	0.012 \pm 0.002	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
NECA					
MRS-1523					
2Cl-IB-MECA	1.3 \pm 0.1	109 \pm 45	0.011 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales *knock-down* para IR-B en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles en presencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2Cl-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 .

Tabla 12. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC normales *knock-down* para IR-A e IR-B.

Transporte de L-arginina					
	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X F$	$1/Ins^X F$
<i>Sin insulina</i>					
<i>Normal</i>	1.0 ± 0.1	79 ± 46	0.012 ± 0.001	1.0 ± 0.1	-
Control	1.0 ± 0.1	66 ± 44	0.015 ± 0.001	1.0 ± 0.1	-
ZM-241385	1.0 ± 0.1	84 ± 33	0.012 ± 0.001	0.8 ± 0.1	-
DPCPX	1.0 ± 0.1	65 ± 45	0.015 ± 0.003	1.0 ± 0.1	-
MRS-1754	1.2 ± 0.1	69 ± 32	0.017 ± 0.003	1.1 ± 0.1	-
MRS-1523	1.1 ± 0.1	67 ± 38	0.016 ± 0.003	1.1 ± 0.1	-
CGS-21680	1.1 ± 0.1	85 ± 44	0.013 ± 0.001	0.9 ± 0.1	-
CPA	1.2 ± 0.1	82 ± 45	0.015 ± 0.003	1.0 ± 0.1	-
NECA	1.1 ± 0.1	89 ± 32	0.012 ± 0.001	0.8 ± 0.1	-
2Cl-IB-MECA	1.0 ± 0.1	83 ± 22	0.012 ± 0.001	0.8 ± 0.1	-
ZM-241385	1.0 ± 0.1	92 ± 33	0.011 ± 0.001	0.7 ± 0.1	-
CGS-21680					
DPCPX	1.1 ± 0.1	79 ± 40	0.014 ± 0.003	0.9 ± 0.1	-
CPA					
MRS-1754	1.0 ± 0.1	83 ± 16	0.012 ± 0.001	0.8 ± 0.1	-
NECA					
MRS-1523	1.1 ± 0.1	78 ± 21	0.014 ± 0.003	0.9 ± 0.1	-
2Cl-IB-MECA					

La tabla continúa en la próxima página.

<i>Continuación</i>	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/Ins/X_F$
<i>Con insulina</i>					
Control	1.0 \pm 0.1	88 \pm 42	0.011 \pm 0.001	0.7 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	90 \pm 49	0.010 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
DPCPX	1.1 \pm 0.1	80 \pm 45	0.013 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
MRS-1754	1.0 \pm 0.1	92 \pm 46	0.011 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
MRS-1523	1.2 \pm 0.1	75 \pm 29	0.016 \pm 0.003	1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3
CGS-21680	0.9 \pm 0.1	99 \pm 34	0.009 \pm 0.001	0.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1
CPA	0.9 \pm 0.1	85 \pm 52	0.011 \pm 0.001	0.7 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
NECA	0.9 \pm 0.1	90 \pm 42	0.010 \pm 0.001	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	0.8 \pm 0.1	82 \pm 33	0.010 \pm 0.001	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	90 \pm 59	0.010 \pm 0.001	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
CGS-21680					
DPCPX	1.2 \pm 0.1	77 \pm 45	0.016 \pm 0.001	1.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3
CPA					
MRS-1754	1.1 \pm 0.1	99 \pm 49	0.011 \pm 0.001	0.7 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
NECA					
MRS-1523	1.1 \pm 0.1	92 \pm 45	0.012 \pm 0.001	0.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA					

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales *knock-down* para IR-A e IR-B en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles en presencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2Cl-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 .

embargo, bloqueado por ZM-241385. Cuando estas células son infectadas con el adenovirus con el siRNA para la isoforma A del receptor de insulina (IR-A), el efecto de insulina fue bloqueado, sin modificarse por la presencia de los agonistas y antagonistas de receptores de adenosina (Figuras 33A/C/D; 35A/C/D; 37A/C/D; Tablas 10, 11, 12). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figuras 33B/D/F; 35B/D/F, 37B/D/F).

5.19 Participación de IR-A e IR-B en el efecto de la activación e inhibición de los receptores de adenosina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC con diabetes gestacional.

El efecto de diabetes gestacional sobre la V_{\max} y V_{\max}/K_m del transporte de L-arginina no fue modificado por los receptores de adenosina A_1 , A_{2B} y A_3 (ver Figura 19A), el cual tampoco fue alterado en presencia de los siRNA para IR-A e IR-B en estas condiciones (Figuras 38A, C y D; 40A y D; 41A, C y D; Tablas 13, 14 y 15). Sin embargo, ZM-241385 bloqueó el efecto de diabetes gestacional en células *knock-down* para IR-B (Figura 40B). Las transformaciones de Eadie-Hofstee de estos datos mostraron que se ajustan a una regresión lineal (Figuras 38B, D y F; 40B, D y F; 41B, D y F).

Cuando células HUVEC de diabetes gestacional son incubadas en presencia de insulina, la V_{\max} y V_{\max}/K_m del transporte de L-arginina vuelve a valores observados en células normales en ausencia de insulina. Este efecto de insulina fue bloqueado al utilizar un antagonista de receptores de adenosina A_1 (DPCPX) y el agonista del receptor de adenosina A_{2A} (CGS-21680) (ver Figura 19B). Este efecto fue bloqueado sólo en las células *knock-down* para IR-B (Figura 41A y C, Tabla 15). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figuras 41B, D y F).

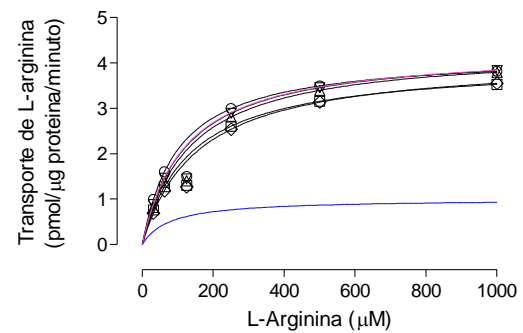
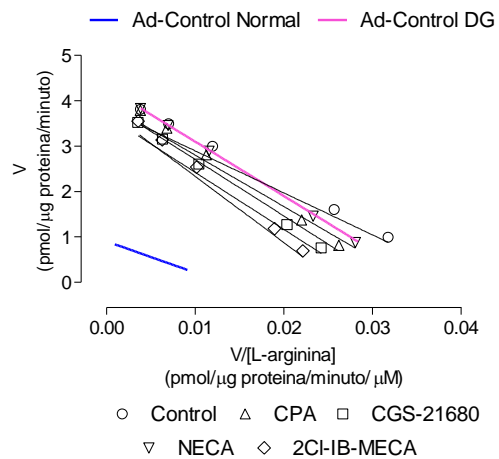
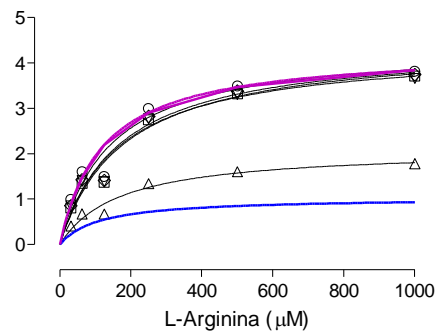
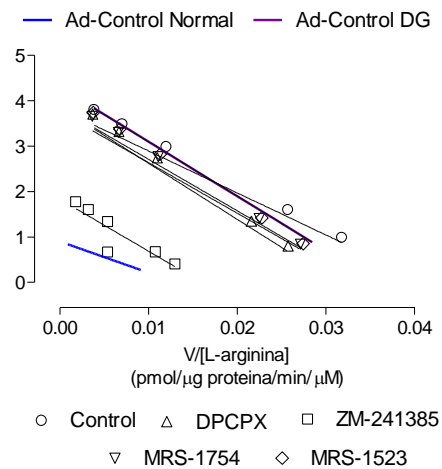
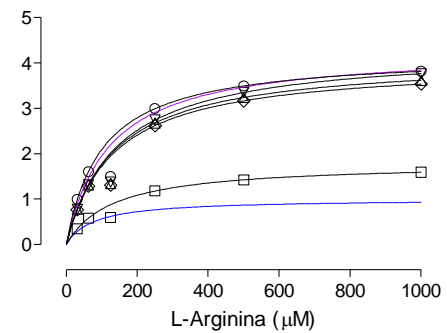
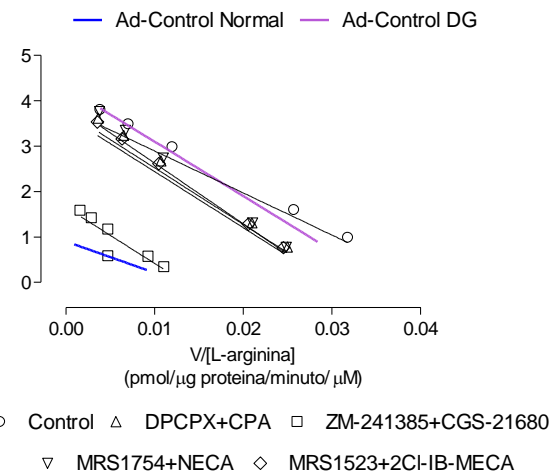
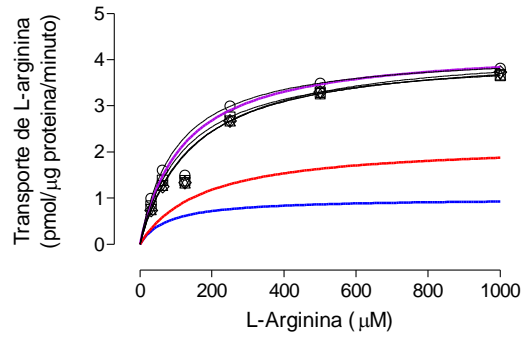
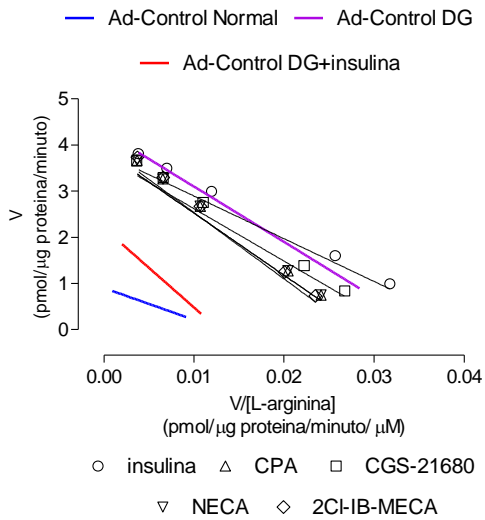
A**B****C****D****E****F***Figura 38 continúa en la página 128*

Figura 38. El aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional *knockdown* para IR-A es vía activación de receptores de adenosina A_{2A}. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional. Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, como se describen en los métodos. (A,C,E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B,D,F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

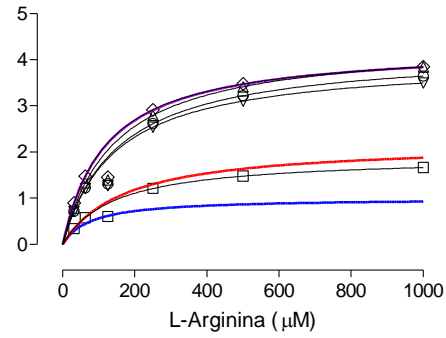
A



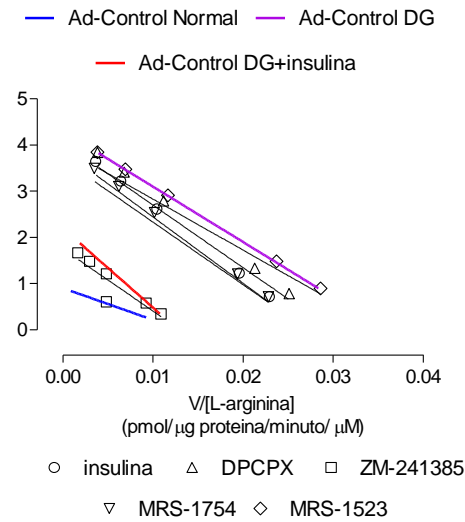
B



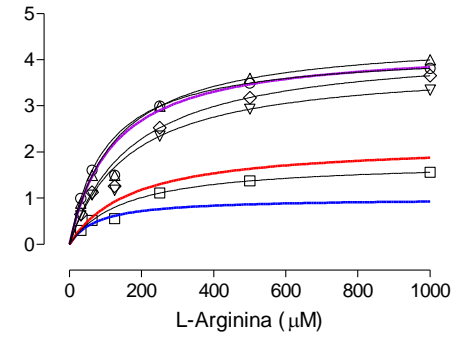
C



D



E



F

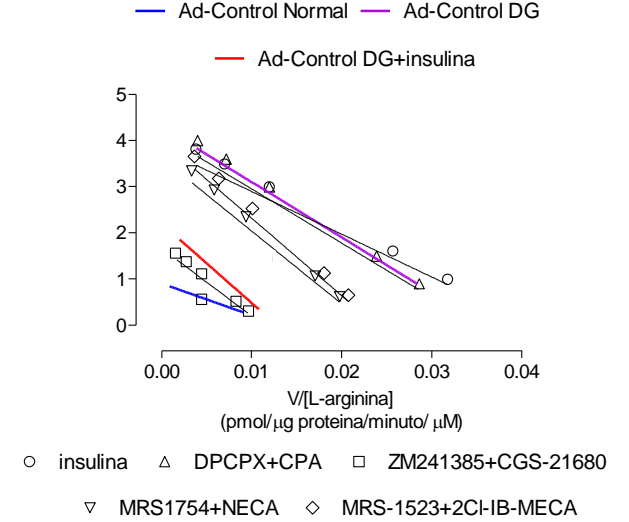


Figura 39 continúa en la página 130

Figura 39. Insulina recupera el transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional *knockdown* para IR-A en presencia de un antagonista de receptores de adenosina A_{2A}. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para la isoforma A del receptor de insulina (IR-A). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, en presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A, C, E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B, D, F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

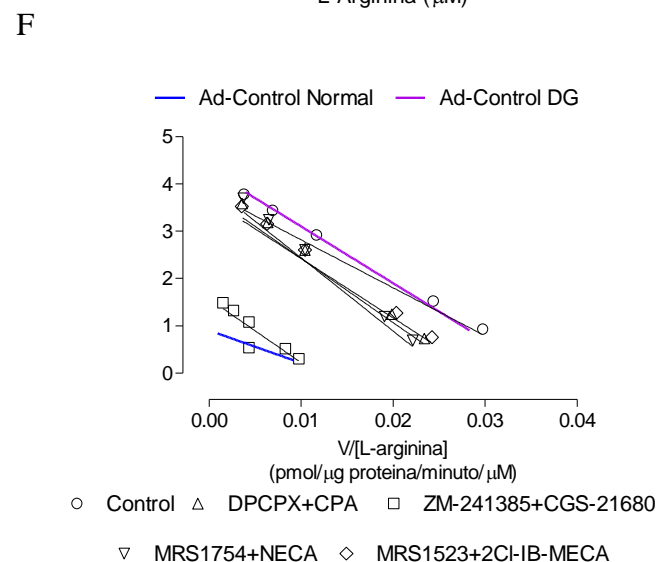
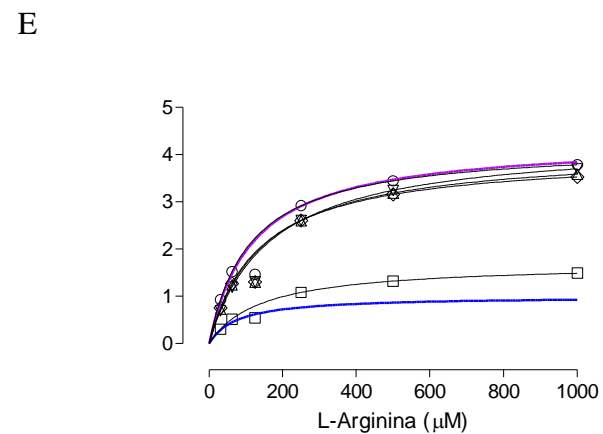
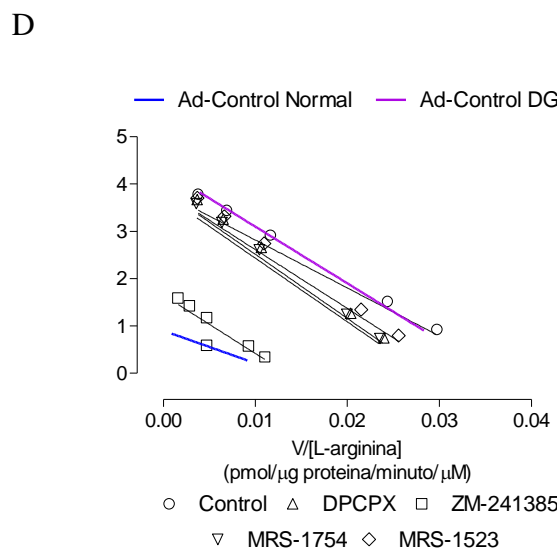
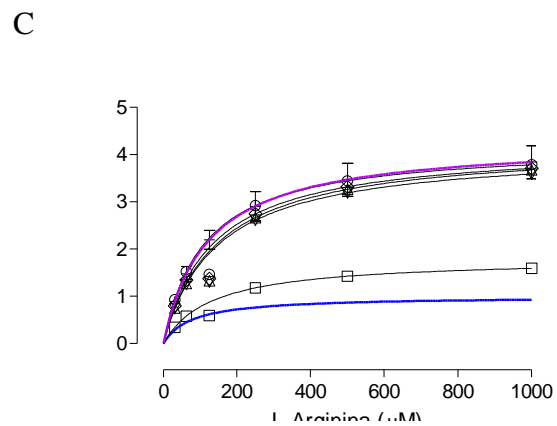
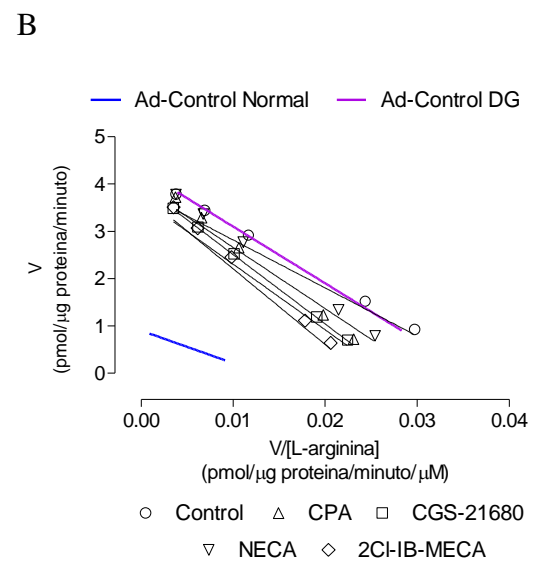
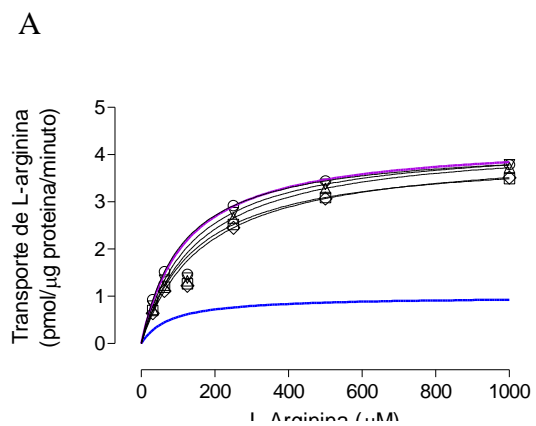
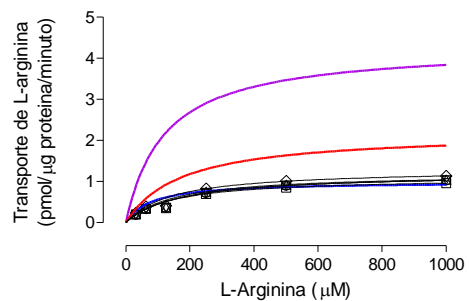


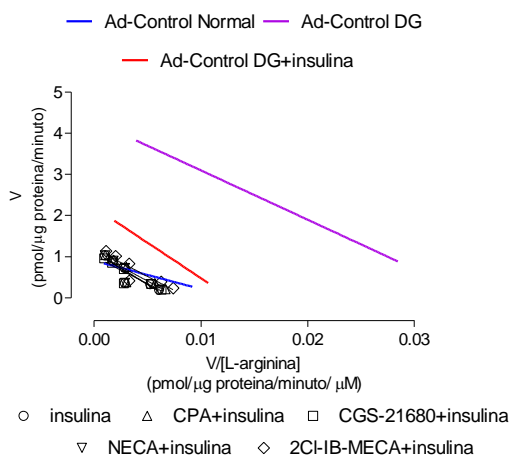
Figura 40 continúa en la página 132

Figura 40. El aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional *knockdown* para IR-B es revertido en presencia de un antagonista de receptores de adenosina A_{2A}. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para la isoforma B del receptor de insulina (IR-B). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, como se describen en los métodos. (A,C,E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B,D,F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

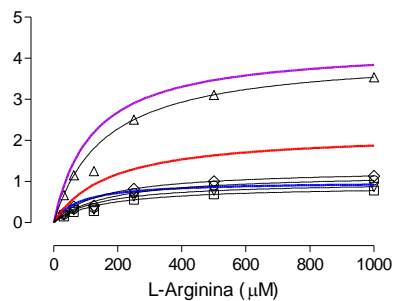
A



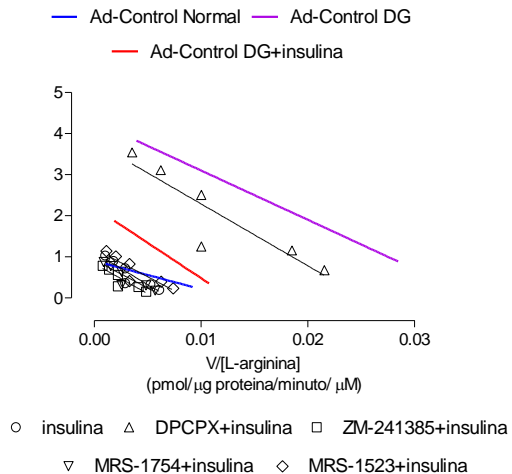
B



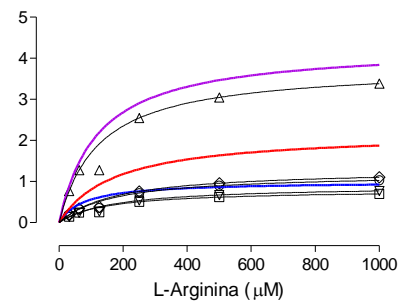
C



D



E



F

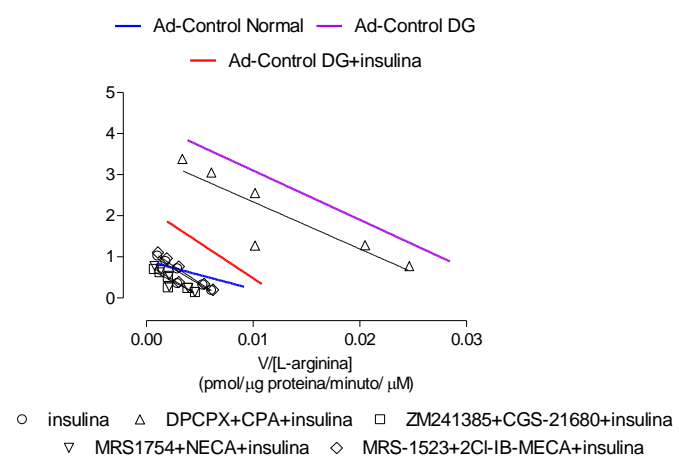
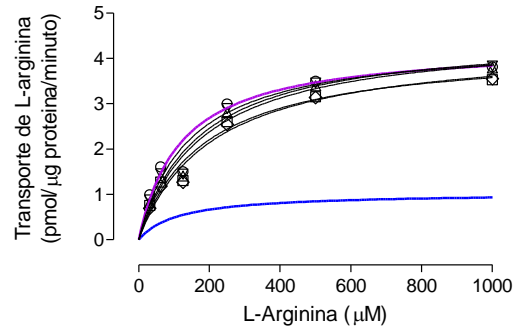


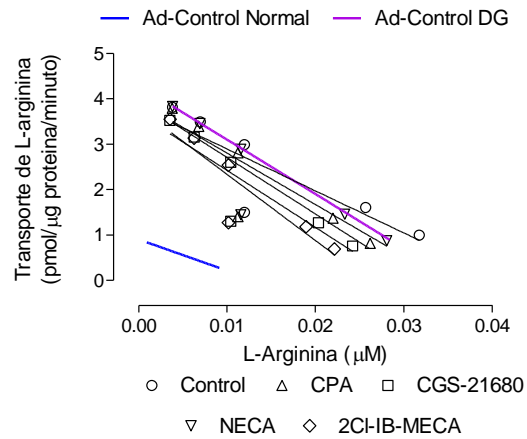
Figura 41 continúa en la página 134

Figura 41. Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional *knockdown* para IR-A de manera dependiente de receptores de adenosina A₁. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para la isoforma B del receptor de insulina (IR-B). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, en presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A, C, E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B, D, F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

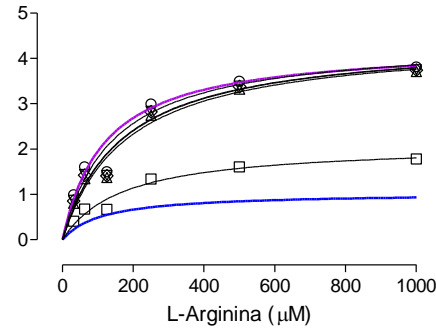
A



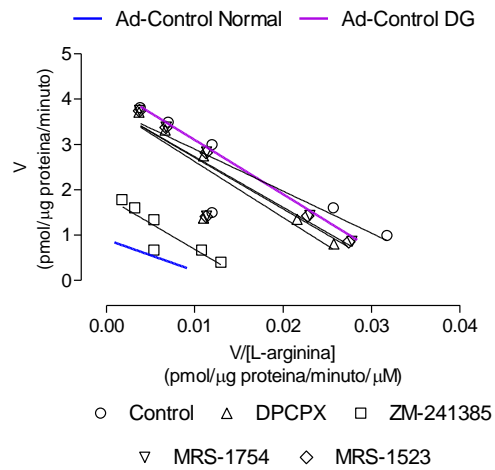
B



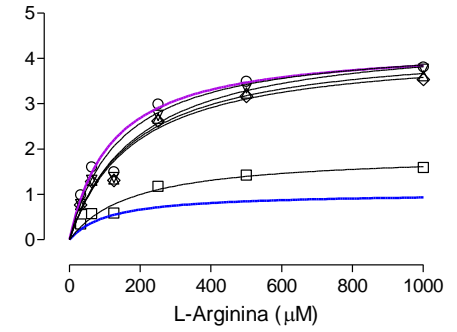
C



D



E



F

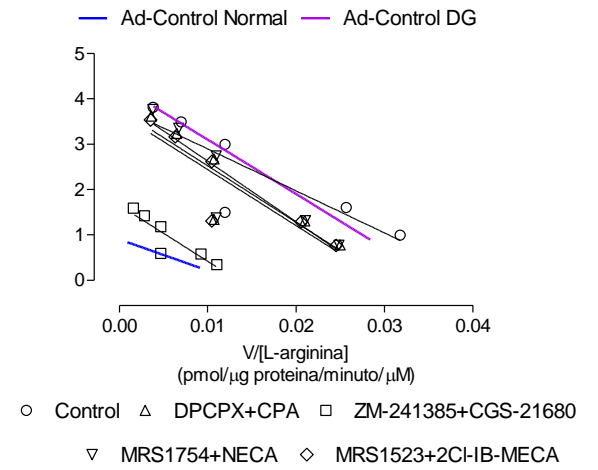


Figura 42 continúa en la página 136

Figura 42. El aumento transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional *knockdown* para IR-A e IR-B solo se bloqueó en presencia de un antagonista de receptores de adenosina A_{2A}. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para las isoformas A y B del receptor de insulina (IR-A+IR-B). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁ A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, como se describen en los métodos. (A,C,E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B,D,F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

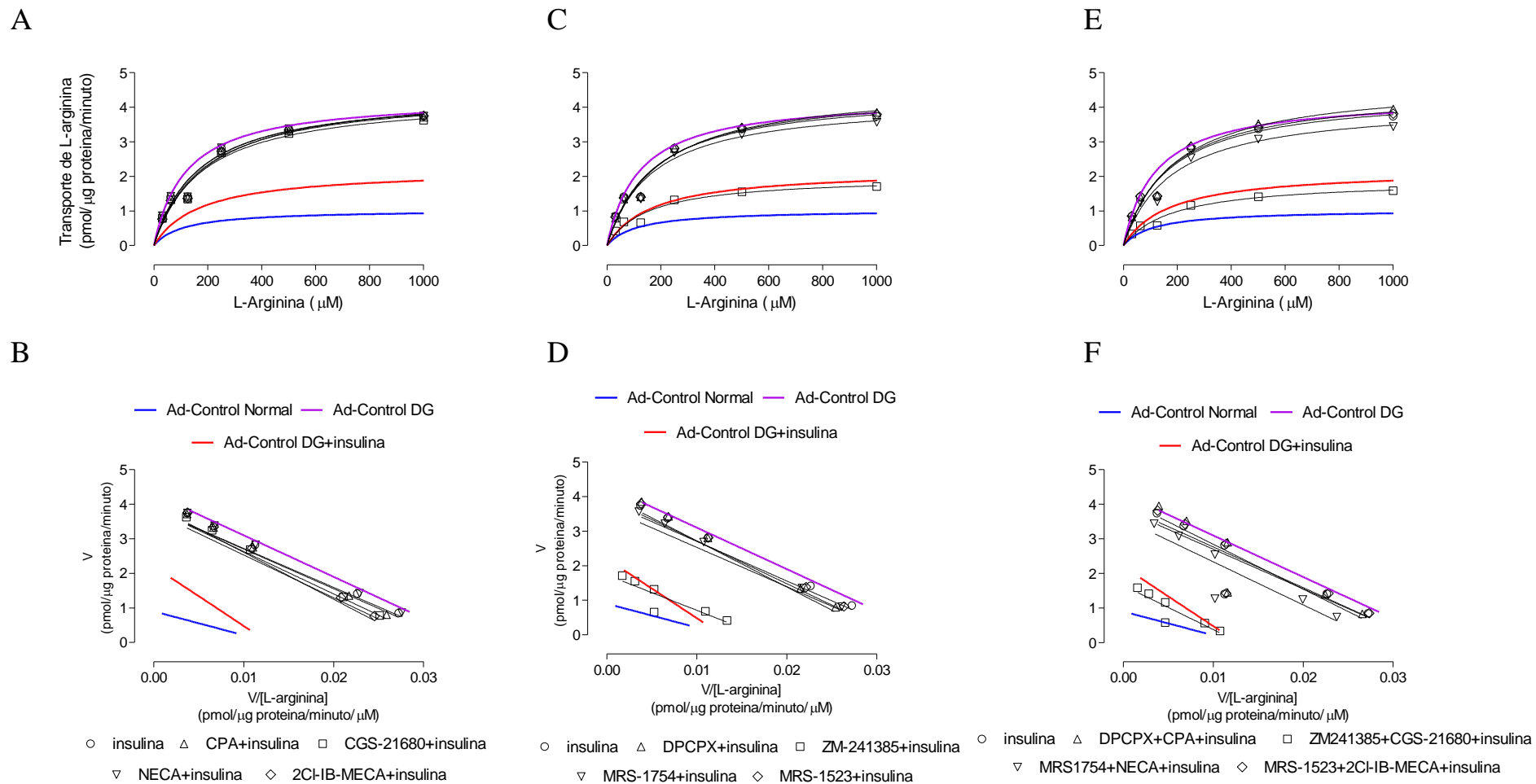


Figura 43 continúa en la página 138

Figura 43. Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina en HUVEC de diabetes gestacional *knockdown* para IR-A e IR-B de una manera dependiente de receptores de adenosina A₁. El transporte saturable de L-arginina fue determinado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para la isoforma A y B del receptor de insulina (IR-A+IR-B). Las células fueron incubadas en presencia de L-arginina (15-1000 μ M, 3 μ Ci/mL L-[³H]arginina, 37°C, 1 minuto) en ausencia y presencia de agonistas (A y B; CPA 30 nM, CGS-21680 30 nM, NECA 1 μ M, 2Cl-IB-MECA 50 nM, 8 horas), antagonistas (C y D; DPCPX 30 nM, ZM-241385 10 nM, MRS-1754 30 nM, MRS1523 30 nM) y las combinaciones agonistas+antagonistas (E y F) de receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, respectivamente, en presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describen en los métodos. (A, C, E) Los datos del transporte de L-arginina saturable fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten sin componente lineal. (B, D, F) Transformación de Eadie-Hofstee para los datos en A, C y E, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=6-12.

Tabla 13. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC con diabetes gestacional *knock-down* para IR-A.

Transporte de L-arginina						
	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/GD/X_F$	$1/GD-Ins/X_F$
<i>Sin insulina</i>						
<i>Normal</i>	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	-
Control	4.2 \pm 0.3* [†]	101 \pm 43	0.041 \pm 0.004*	3.4 \pm 0.3*	1.0 \pm 0.1*	-
ZM-241385	2.0 \pm 0.5*	123 \pm 61	0.016 \pm 0.001* [†]	1.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	-
DPCPX	4.2 \pm 0.3* [†]	132 \pm 56	0.031 \pm 0.008*	2.5 \pm 0.1*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS1754	4.1 \pm 0.3* [†]	120 \pm 63	0.034 \pm 0.003*	2.8 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS1523	4.2 \pm 0.3* [†]	122 \pm 52	0.034 \pm 0.003*	2.8 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
CGS-21680	4.0 \pm 0.3* [†]	134 \pm 66	0.029 \pm 0.002*	2.4 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*	-
CPA	4.3 \pm 0.3* [†]	133 \pm 53	0.032 \pm 0.003*	2.6 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
NECA	4.3 \pm 0.3* [†]	122 \pm 55	0.035 \pm 0.003*	2.9 \pm 0.3*	0.9 \pm 0.1*	-
2Cl-IB-MECA	4.1 \pm 0.3* [†]	154 \pm 44	0.026 \pm 0.003*	2.1 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*	-
ZM-241385	1.8 \pm 0.2*	132 \pm 55	0.013 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	-
CGS-21680						
DPCPX	4.1 \pm 0.3* [†]	133 \pm 64	0.030 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	-
CPA						
MRS-1754	4.3 \pm 0.3* [†]	142 \pm 34	0.030 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	-
NECA						
MRS-1523	4.0 \pm 0.3* [†]	132 \pm 66	0.030 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	-
2Cl-IB-MECA						

La tabla continúa en la próxima página.

<i>Continuación</i>	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/GD/X_F$	$1/GD-Ins/X_F$
<i>Con Insulina</i>						
Control	4.2 \pm 0.4* [†]	152 \pm 54	0.027 \pm 0.005*	2.2 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1
ZM-241385	1.9 \pm 0.2*	143 \pm 72	0.013 \pm 0.006	1.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1 [‡]
DPCPX	4.4 \pm 0.4* [†]	144 \pm 65	0.030 \pm 0.008*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	1.1 \pm 0.1
MRS1754	4.0 \pm 0.4* [†]	144 \pm 82	0.028 \pm 0.001*	2.3 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1
MRS1523	4.3 \pm 0.4* [†]	119 \pm 77	0.036 \pm 0.001*	3.0 \pm 0.3*	0.9 \pm 0.1*	1.3 \pm 0.1
CGS-21680	4.1 \pm 0.4* [†]	122 \pm 82	0.034 \pm 0.003*	2.8 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	1.3 \pm 0.1
CPA	4.2 \pm 0.4* [†]	143 \pm 63	0.029 \pm 0.001*	2.4 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	1.1 \pm 0.1
NECA	4.2 \pm 0.4* [†]	143 \pm 62	0.029 \pm 0.002*	2.4 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	4.3 \pm 0.4* [†]	152 \pm 32	0.028 \pm 0.001*	2.3 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1
ZM-241385	1.8 \pm 0.2*	155 \pm 95	0.011 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1 [‡]
CGS-21680						
DPCPX	4.5 \pm 0.4* [†]	126 \pm 36	0.035 \pm 0.003*	2.9 \pm 0.3*	0.9 \pm 0.1*	1.3 \pm 0.1
CPA						
MRS-1754	3.9 \pm 0.4* [†]	166 \pm 33	0.023 \pm 0.002*	1.9 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.1
NECA						
MRS-1523	4.3 \pm 0.4* [†]	176 \pm 56	0.024 \pm 0.001*	2.0 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA						

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para IR-A en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{max}/K_m); $1/DG^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC con diabetes gestacional controles en ausencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte; $1/DG-Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC con diabetes gestacional en presencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A}; DPCPX, antagonista de RA tipo A₁; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B}; MRS-1523, antagonista de RA tipo A₃; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A}; CPA, agonista de RA tipo A₁; NECA, agonista de RA tipo A_{2B}; 2Cl-IB-MECA, agonista de RA tipo A₃. *P<0.05 con respecto a *Normal*. †P<0.05 con respecto a células HUVEC en presencia de insulina y de ZM-241385. ‡P<0.05 con respecto a células HUVEC controles en presencia de insulina.

Tabla 14. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC con diabetes gestacional *knock-down* para IR-B.

Transporte de L-arginina						
	V_{max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/GD/X_F$	$1/GD-Ins/X_F$
<i>Sin insulina</i>						
Normal	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	-
Control	4.2 \pm 0.4*†	110 \pm 43	0.038 \pm 0.004*	3.5 \pm 0.4#	1.0 \pm 0.1*	-
ZM-241385	1.8 \pm 0.1*	132 \pm 61	0.014 \pm 0.001	1.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	-
DPCPX	4.2 \pm 0.4*†	144 \pm 56	0.029 \pm 0.008*	2.6 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS1754	4.1 \pm 0.4*†	143 \pm 63	0.029 \pm 0.003*	2.6 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS1523	4.2 \pm 0.4*†	133 \pm 52	0.032 \pm 0.003*	2.9 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
CGS-21680	4.0 \pm 0.4*†	147 \pm 66	0.027 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	-
CPA	4.3 \pm 0.4*†	155 \pm 53	0.028 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	-
NECA	4.3 \pm 0.4*†	138 \pm 55	0.031 \pm 0.003*	2.8 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	-
2Cl-IB-MECA	4.1 \pm 0.4*†	168 \pm 44	0.024 \pm 0.002*	2.2 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*	-
ZM-241385	1.7 \pm 0.1*	143 \pm 55	0.012 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	-
CGS-21680						
DPCPX	4.1 \pm 0.4*†	144 \pm 64	0.028 \pm 0.003*	2.5 \pm 0.3*	0.7 \pm 0.1*	-
CPA						
MRS-1754	4.3 \pm 0.4*†	163 \pm 34	0.026 \pm 0.003*	2.4 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	-
NECA						
MRS-1523	4.0 \pm 0.4*†	134 \pm 66	0.029 \pm 0.003*	2.6 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	-
2Cl-IB-MECA						

La tabla continúa en la próxima página.

Continuación

	V_{\max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/GD^X_F$	$1/GD\text{-Ins}^X_F$
Con insulina						
Control	1.2 \pm 0.1	166 \pm 54	0.007 \pm 0.001	0.6 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
ZM-241385	0.9 \pm 0.1	154 \pm 72	0.005 \pm 0.001	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
DPCPX	4.1 \pm 0.4* \dagger	159 \pm 65	0.025 \pm 0.002*	2.3 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	3.6 \pm 0.4 \ddagger
MRS1754	1.0 \pm 0.1	144 \pm 82	0.007 \pm 0.001	0.6 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
MRS1523	1.3 \pm 0.1	145 \pm 77	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
CGS-21680	1.1 \pm 0.1	143 \pm 82	0.008 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
CPA	1.2 \pm 0.1	148 \pm 63	0.008 \pm 0.001	0.7 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
NECA	1.2 \pm 0.1	165 \pm 62	0.007 \pm 0.001	0.6 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	1.3 \pm 0.1	144 \pm 32	0.009 \pm 0.001	0.8 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
ZM-241385	0.8 \pm 0.1	144 \pm 95	0.006 \pm 0.001	0.5 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
CGS-21680	0.8 \pm 0.1	144 \pm 95	0.006 \pm 0.001	0.5 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
DPCPX	3.8 \pm 0.3* \dagger	123 \pm 36	0.031 \pm 0.003*	2.8 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	4.4 \pm 0.4 \ddagger
CPA	3.8 \pm 0.3* \dagger	123 \pm 36	0.031 \pm 0.003*	2.8 \pm 0.3*	0.8 \pm 0.1*	4.4 \pm 0.4 \ddagger
MRS-1754	0.9 \pm 0.1	167 \pm 33	0.005 \pm 0.001	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
NECA	0.9 \pm 0.1	167 \pm 33	0.005 \pm 0.001	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
MRS-1523	1.3 \pm 0.1	177 \pm 56	0.007 \pm 0.001	0.6 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
2Cl-IB-MECA	1.3 \pm 0.1	177 \pm 56	0.007 \pm 0.001	0.6 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para IR-B en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/DG^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC con diabetes gestacional controles en ausencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte; $1/DG-Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC con diabetes gestacional en presencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2CI-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 . * $P < 0.05$ con respecto a *Normal*. † $P < 0.05$ con respecto a células HUVEC en ausencia de insulina y presencia de ZM-241385. # $P < 0.05$ con respecto al resto de los valores en $1/C^X F$. ‡ $P < 0.05$ con respecto a células HUVEC controles en presencia de insulina.

Tabla 15. Parámetros cinéticos del transporte saturable de L-arginina en presencia de agonistas y/antagonistas de receptores de adenosina en HUVEC con diabetes gestacional *knock-down* para IR-A e IR-B.

Transporte de L-arginina						
	V_{max} (pmol/ μ g proteína/minuto)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (pmol/ μ g proteína/minuto/(μ M))	$1/C^X_F$	$1/GD^X_F$	$1/GD-Ins^X_F$
<i>Sin insulina</i>						
<i>Normal</i>	1.0 \pm 0.1	79 \pm 46	0.012 \pm 0.001	1.0 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	-
Control	4.2 \pm 0.4* \dagger	101 \pm 43	0.041 \pm 0.004* \dagger	2.7 \pm 0.3*	1.0 \pm 0.1*	-
ZM-241385	2.0 \pm 0.2*	123 \pm 61	0.016 \pm 0.001*	1.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	-
DPCPX	4.2 \pm 0.4* \dagger	132 \pm 56	0.032 \pm 0.003* \dagger	2.1 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS1754	4.1 \pm 0.4* \dagger	120 \pm 63	0.034 \pm 0.003* \dagger	2.3 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS1523	4.2 \pm 0.4* \dagger	122 \pm 52	0.034 \pm 0.003* \dagger	2.3 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	-
CGS-21680	4.0 \pm 0.4* \dagger	134 \pm 66	0.030 \pm 0.002* \dagger	2.0 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	-
CPA	4.3 \pm 0.4* \dagger	133 \pm 53	0.032 \pm 0.003* \dagger	2.1 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	-
NECA	4.3 \pm 0.4* \dagger	122 \pm 55	0.035 \pm 0.003* \dagger	2.3 \pm 0.2*	0.9 \pm 0.1*	-
2CI-IB-MECA	4.1 \pm 0.4* \dagger	154 \pm 44	0.027 \pm 0.003* \dagger	1.8 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	-
ZM-241385	1.8 \pm 0.1*	132 \pm 55	0.014 \pm 0.003	0.9 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	-
CGS-21680						
DPCPX						
CPA	4.1 \pm 0.4* \dagger	133 \pm 64	0.031 \pm 0.003* \dagger	2.1 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	-
MRS-1754						
NECA	4.3 \pm 0.4* \dagger	142 \pm 34	0.030 \pm 0.003* \dagger	2.0 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	-
MRS-1523						
2CI-IB-MECA	4.0 \pm 0.4* \dagger	132 \pm 66	0.030 \pm 0.003* \dagger	2.0 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	-

La tabla continúa en la próxima página.

<i>Continuación</i>	V_{\max} (pmol/ μ g protein/minute)	K_m (μ M)	V_{\max}/K_m (pmol/ μ g protein/minute/(μ M))	$1/C/X_F$	$1/GD/X_F$	$1/GD-Ins/X_F$
<i>Con insulina</i>						
Control	4.2 \pm 0.4*†	123 \pm 43	0.034 \pm 0.003*†	2.3 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1*
ZM-241385	1.9 \pm 0.1*	111 \pm 61	0.017 \pm 0.001*	1.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
DPCPX	4.4 \pm 0.4*†	142 \pm 56	0.036 \pm 0.003*†	2.4 \pm 0.2*	0.9 \pm 0.1*	1.1 \pm 0.1*
MRS1754	4.0 \pm 0.4*†	122 \pm 63	0.033 \pm 0.003*†	2.2 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1*
MRS1523	4.3 \pm 0.4*†	132 \pm 52	0.033 \pm 0.003*†	2.2 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1*
CGS-21680	4.1 \pm 0.4*†	132 \pm 66	0.031 \pm 0.003*†	2.1 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.1*
CPA	4.2 \pm 0.4*†	131 \pm 53	0.032 \pm 0.003*†	2.1 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.1*
NECA	4.2 \pm 0.4*†	121 \pm 55	0.035 \pm 0.003*†	2.3 \pm 0.2*	0.9 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1*
2Cl-IB-MECA	4.3 \pm 0.4*†	144 \pm 44	0.030 \pm 0.003*†	2.0 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.1*
ZM-241385	1.8 \pm 0.1*	136 \pm 64	0.013 \pm 0.001	0.9 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
CGS-21680						
DPCPX						
CPA	4.5 \pm 0.4*†	138 \pm 34	0.033 \pm 0.003*†	2.2 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	0.9 \pm 0.1*
MRS-1754						
NECA	3.9 \pm 0.4*†	133 \pm 66	0.029 \pm 0.003*†	1.9 \pm 0.2*	0.7 \pm 0.1*	1.5 \pm 0.1*
MRS-1523						
2Cl-IB-MECA	4.3 \pm 0.4*†	126 \pm 56	0.034 \pm 0.003*†	2.3 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.1*

Transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para IR-A e IR-B en presencia o ausencia de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina como se describen en los métodos. V_{\max} , velocidad máxima. K_m , constante de Michaelis-Menten. V_{\max}/K_m , capacidad máxima de transporte. $1/C^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC controles normales sin insulina sobre la capacidad máxima de transporte (V_{\max}/K_m); $1/DG^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC con diabetes gestacional controles en ausencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte; $1/DG-Ins^X F$, corresponde al efecto relativo para el transporte de L-arginina de las diferentes condiciones con respecto a células HUVEC con diabetes gestacional en presencia de insulina sobre la capacidad máxima de transporte. ZM-241385, antagonista de receptor de adenosina (RA) tipo A_{2A} ; DPCPX, antagonista de RA tipo A_1 ; MRS-1754, antagonista de RA tipo A_{2B} ; MRS-1523, antagonista de RA tipo A_3 ; CGS-21680, agonista de RA tipo A_{2A} ; CPA, agonista de RA tipo A_1 ; NECA, agonista de RA tipo A_{2B} ; 2Cl-IB-MECA, agonista de RA tipo A_3 . * $P < 0.05$ con respecto a *Normal*. † $P < 0.05$ con respecto a células HUVEC en ausencia de insulina y presencia de ZM-241385.

El efecto de insulina en células HUVEC de diabetes gestacional no fue modificado por agonistas y/o antagonistas de receptores A_{2B} y A_3 (ver Figura 19B). La V_{\max} y V_{\max}/K_m del transporte de L-arginina en estas condiciones no fue modificado en presencia de los siRNA para IR-A (Figuras 39A, 42A y 43A; Tablas 13, 15). La transformación de Eadie-Hofstee de estos datos mostró que se ajustan a una regresión lineal (Figuras 39B, D y F; 42B, D y F; 43B, D y F).

5.20 Efecto de los receptores de adenosina e insulina sobre la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC.

Como se comentó anteriormente, en HUVEC normales insulina aumentó la abundancia relativa de la proteína hCAT-1 (ver Figura 7A). El efecto de insulina sobre la abundancia de proteína de hCAT-1 fue bloqueado en células incubadas con ZM-241385 (antagonistas de receptores de adenosina A_{2A}) (Figura 44A). Sin embargo, HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional (DG) mostrarón un aumento en la abundancia relativa de la proteína hCAT-1, efecto que fue bloqueado por insulina (ver Figura 7A). El efecto de insulina observado en estas células fue bloqueado sólo en las células incubadas con DPCPX (antagonista de receptores de adenosina A_1) (Figura 44B).

5.21 Efecto de IR-A e IR-B sobre la activación e inhibición de receptores de adenosina en la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC.

En HUVEC procedentes de embarazos normales, insulina aumenta la abundancia de proteína para hCAT-1, efecto que desaparece en células *knock-down* para las isoformas A y B del receptor de insulina (IR-A e IR-B), los cuales además no fueron modificados en

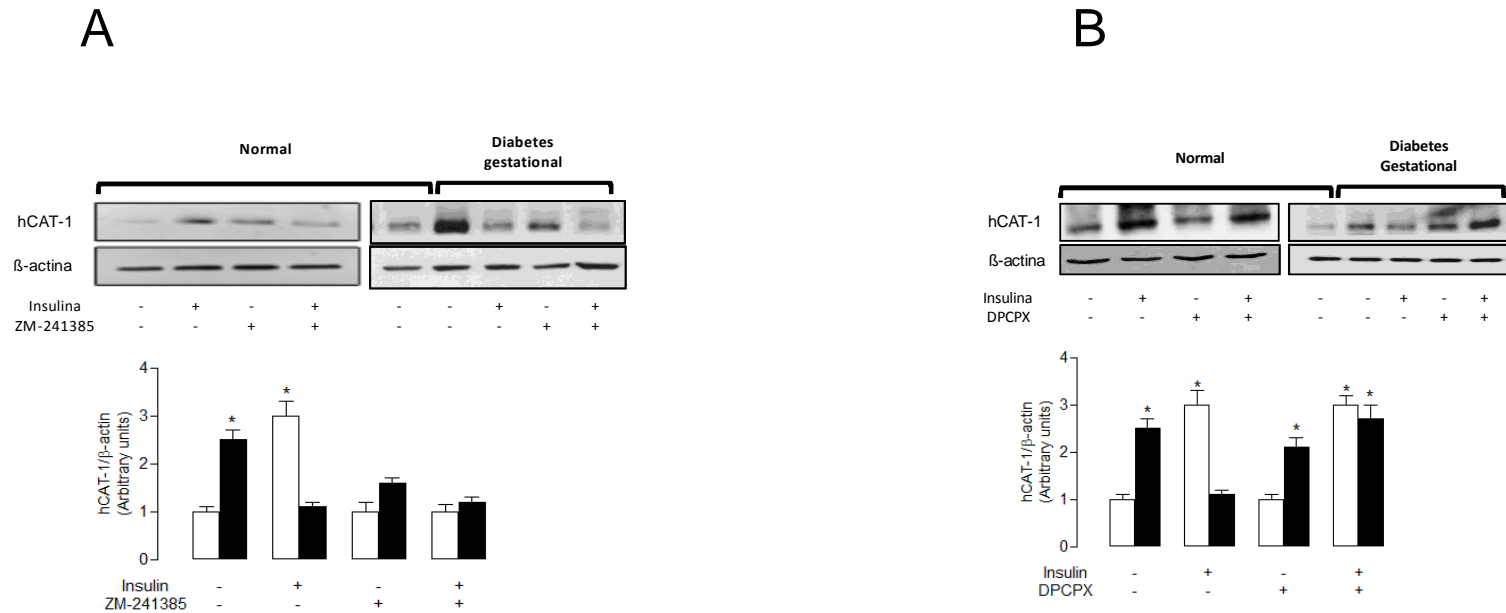


Figura 44. Insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A1 para revertir el aumento de la abundancia de proteína para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales (barras blancas) y de diabetes gestacional (DG, barras negras) mediante western-blot en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas) y/o antagonistas de receptores de adenosina A2A (A) y A1 (B). Se utilizaron anticuerpos *anti*-hCAT-1 (1:250) y *anti*-β-actina (1:2500), como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=3. En A, * $P < 0.05$ con respecto normal control y en presencia de ZM-241385, y diabetes gestacional en presencia de insulina y/o ZM-241385. En B, * $P < 0.05$ con respecto a control y presencia de DPCPX en normal, y en células DG en presencia de insulina.

presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} (Figuras 45A,B; 46A,B).

Por otro lado, en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, la abundancia de proteína para hCAT-1 está aumentada, efecto que fue bloqueado solo por ZM-241385 en células *knock-down* para IR-A e IR-B en ausencia de insulina (Figura 48A, B). Ahora, si estas células son incubadas con insulina, el efecto de diabetes es revertido a valores cercanos a HUVEC normales sin insulina, efecto que fue bloqueado en presencia de DPCPX y CGS-21680 en células *knock-down* para IR-B (Figuras 47B, 48B).

5.22 Partipación de IR-A e IR-B sobre la activación e inhibición de receptores de adenosina en los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC.

En HUVEC procedentes de embarazos normales, insulina aumenta la abundancia de proteína para hCAT-1, efecto que desaparece en células *knock-down* para las isoformas A y B del receptor de insulina (IR-A e IR-B), los cuales además no fueron modificados en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} (Figuras 49A,B; 50A,B).

Por otro lado, HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, la abundancia de proteína para hCAT-1 está aumentada, efecto que fue bloqueado solo por ZM-241385 en células *knock-down* para IR-A e IR-B (Figura 52A,B). Ahora, si estas células son incubadas con insulina, el efecto de diabetes es revertido a valores cercanos a HUVEC normales sin insulina, efecto que fue bloqueado en presencia de DPCPX y CGS-21680 en células *knock-down* para IR-B (Figuras 51B, 52B).

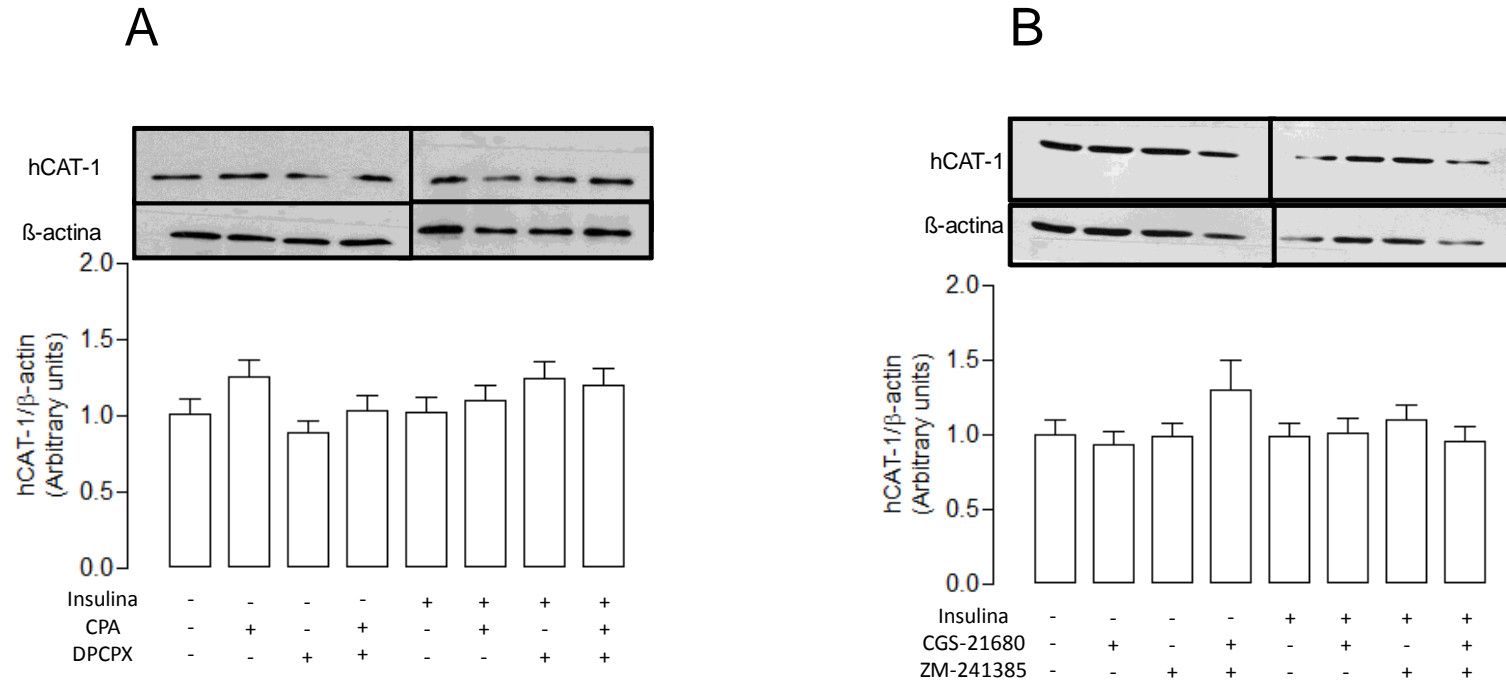


Figura 45. Insulina requiere de IR-A e IR-B para aumentar la abundancia de proteína de hCAT-1 en HUVEC normales, efecto que no es modificado por agonistas y antagonistas de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales *knock-down* para IR-A mediante western-blot en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁ (A) y A_{2A} (B). Se utilizaron anticuerpos *anti*-hCAT-1 (1:250) y *anti*-β-actina (1:2500), como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=3.

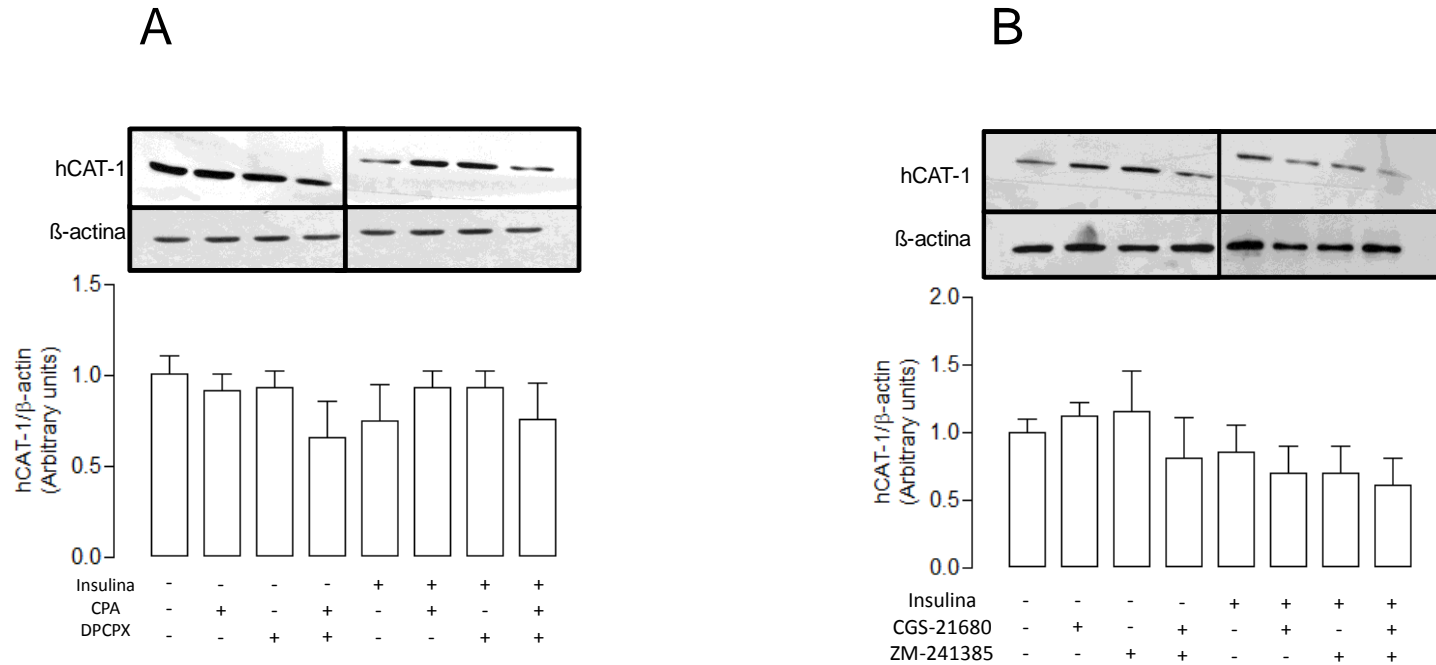


Figura 46. Insulina requiere de IR-A e IR-B para aumentar la abundancia de proteína de hCAT-1 en HUVEC normales efecto que no es modificado por agonistas y antagonistas de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales *knock-down* para IR-B mediante western-blot en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁ (A) y A_{2A} (B). Se utilizaron anticuerpos *anti*-hCAT-1 (1:250) y *anti*- β -actina (1:2500), como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=3.

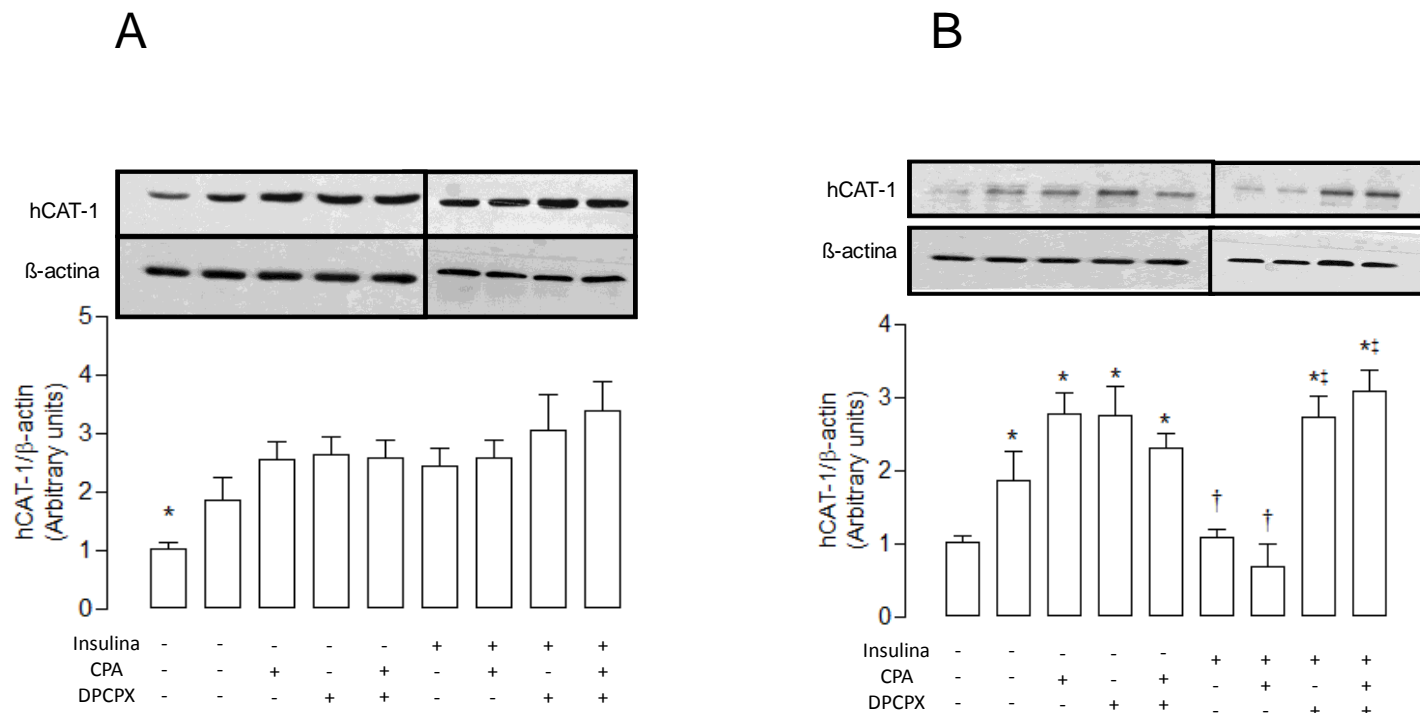


Figura 47. Insulina requiere de IR-A, y de la activación de receptores de adenosina A₁ para revertir el aumento de la abundancia de proteína de hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para IR-A (A) e IR-B (B) mediante western-blot en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁. Se utilizaron anticuerpos *anti*-hCAT-1 (1:250) y *anti*- β -actina (1:2500), como se describe en los métodos. La primera barra corresponde a células controles normales. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=3. En A, * P <0.05 con respecto al resto de los valores observados. En B, * P <0.05 con respecto al control normal. † P <0.05 con respecto a células con diabetes gestacional en ausencia de insulina. ‡ P <0.05 con respecto a células con diabetes gestacional en presencia de insulina y en ausencia de DPCPX.

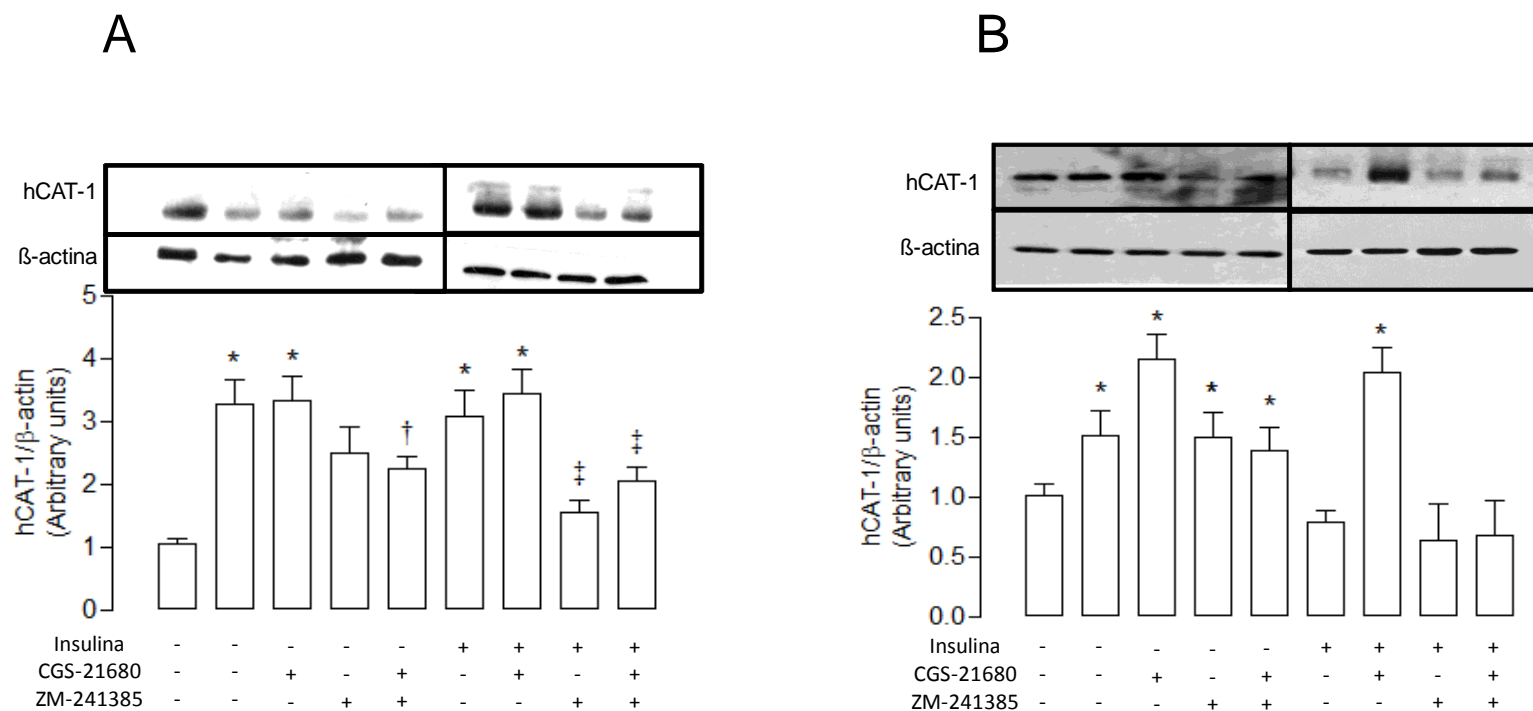


Figura 48. Insulina requiere de IR-A, pero no de la activación de receptores de adenosina A_{2A} para revertir el aumento de la abundancia de proteína de hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. La abundancia de proteína para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knock-down* para IR-A (A) e IR-B (B) mediante western-blot en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. Se utilizaron anticuerpos *anti*-hCAT-1 (1:250) y *anti*-β-actina (1:2500), como se describe en los métodos. La primera barra corresponde a células controles normales. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=3. En A, **P*<0.05 con respecto a control normal. †*P*<0.05 con respecto a células con diabetes gestacional en ausencia y presencia de CGS-21680. ‡*P*<0.05 con respecto a células con diabetes gestacional en presencia de insulina, en ausencia y presencia de CGS-21680. En B, **P*<0.05 con respecto al control normal, y células con diabetes gestacional en presencia de insulina y/o ZM-241385.

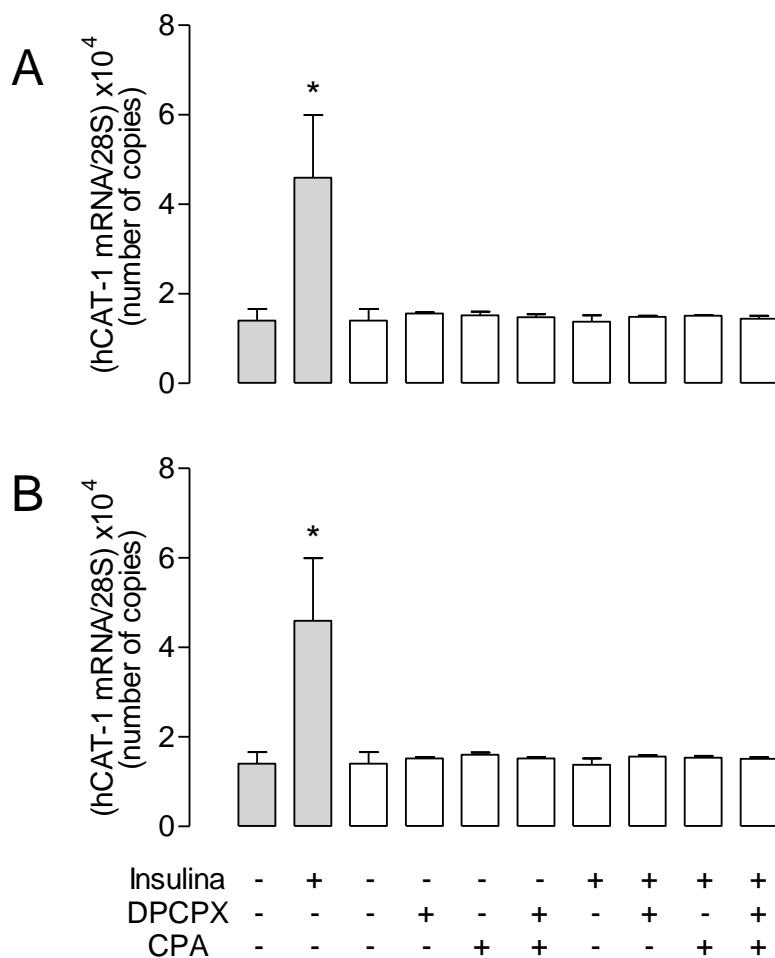


Figura 49. Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A₁ para aumentar niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC normales. Número de copias del mRNA para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales mediante RT-PCR en tiempo real, en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁, y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (A), o IR-B (B). Las barras grises corresponden a HUVEC normales sin infectar. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para hCAT-1 y 28S, como se describen los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=4. * P <0.05 con respecto al resto de las condiciones.

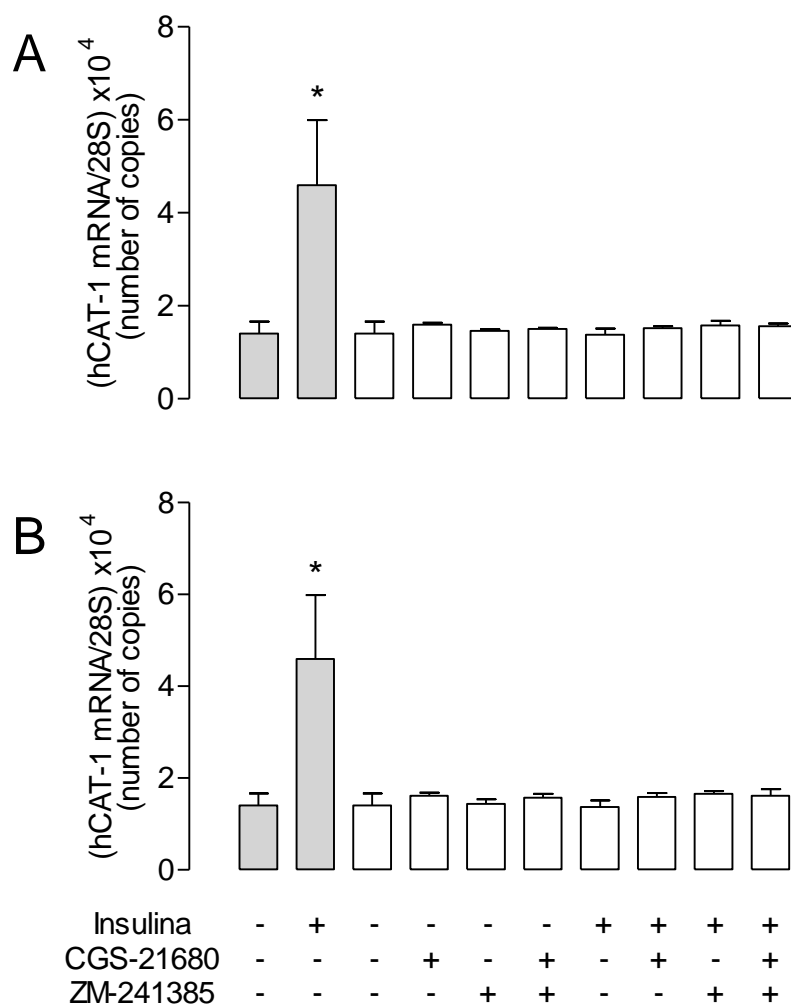


Figura 50. Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A_{2A} para aumentar niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC normales. Número de copias del mRNA para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos normales mediante RT-PCR en tiempo real, en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A_{2A}, y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (A), o IR-B (B). Las barras grises corresponden a HUVEC normales sin infectar. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para hCAT-1 y 28S, como se describen los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=4. * P <0.05 con respecto al resto de las condiciones.

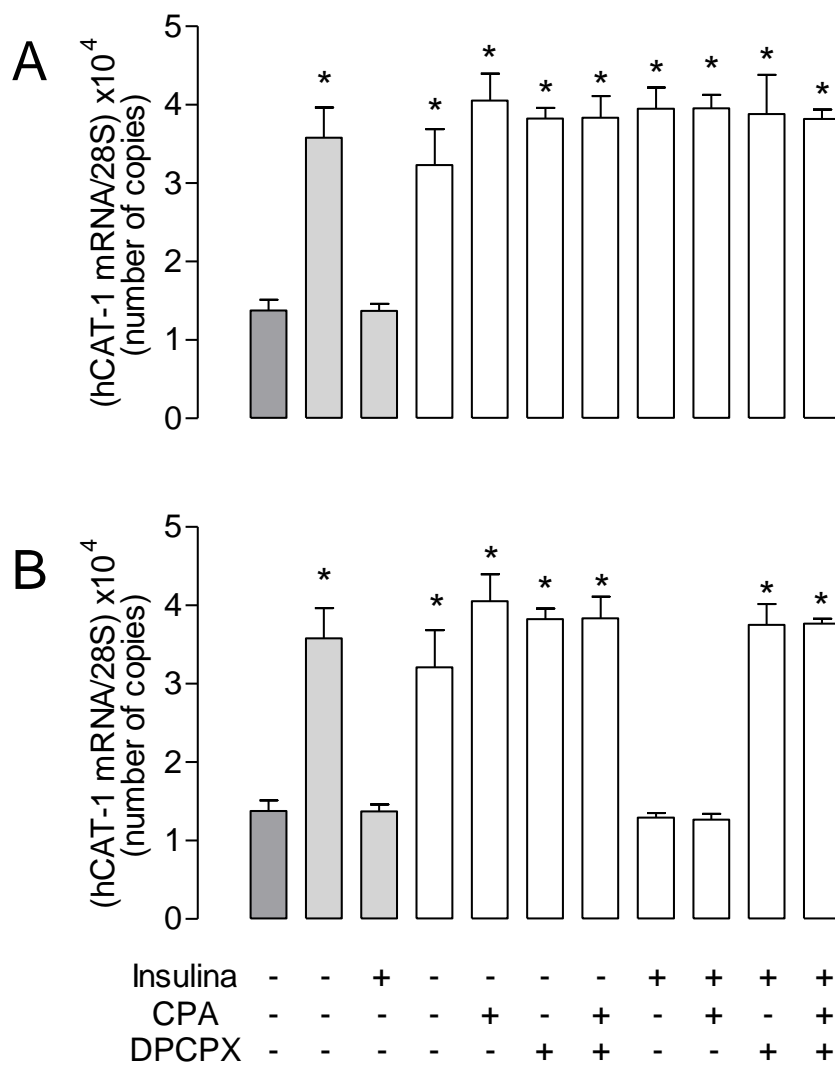


Figura 51. Insulina requiere de IR-A, y receptores de adenosina A₁ para revertir el aumento de los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. Número de copias del mRNA para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional mediante RT-PCR en tiempo real, en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁, y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (A), o IR-B (B). Las barras grises claras corresponden a HUVEC con DG sin infectar, y la barra gris oscura a HUVEC normal. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para hCAT-1 y 28S, como se describen los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=4. En A, * $P < 0.05$ con respecto al control normal y control con diabetes gestacional en presencia de insulina. En B, * $P < 0.05$ con respecto al control normal y control con diabetes gestacional en presencia de insulina, y células *knock-down* para IR-B en presencia de insulina y de CPA.

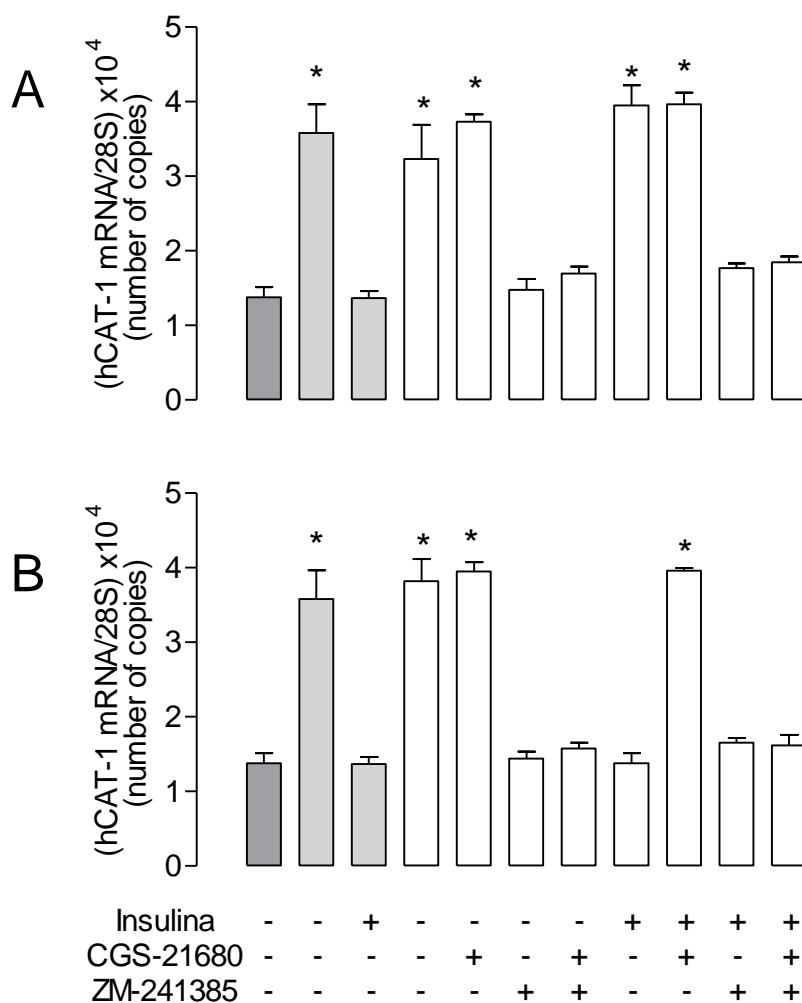


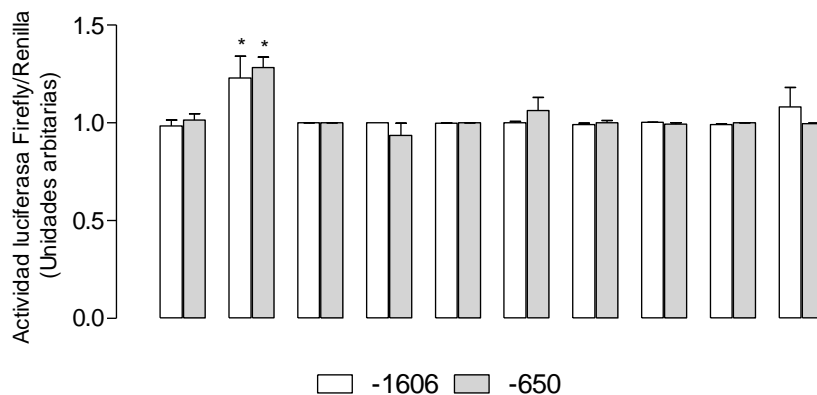
Figura 52. Insulina requiere de IR-A, y no de receptores de adenosina A_{2A} para revertir el aumento de los niveles de mRNA para hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. Número de copias del mRNA para hCAT-1 fue determinada en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional mediante RT-PCR en tiempo real, en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A_{2A}, y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (A), o IR-B (B). Las barras grises claras corresponden a HUVEC con DG sin infectar, y la barra gris oscura a HUVEC normal. Se utilizó oligonucleótidos específicos para hCAT-1 y 28S, como se describen los métodos. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=4. En A, *P<0.05 con respecto al control normal y control con diabetes gestacional en presencia de insulina y células *knock-down* para IR-A en presencia de ZM-241385. En B, *P<0.05 con respecto al control normal y control con diabetes gestacional en presencia de insulina, y células *knock-down* para IR-A en ausencia y presencia de insulina y de ZM-241385.

5.23 Participación de IR-A e IR-B sobre la activación e inhibición de receptores de adenosina en la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en HUVEC.

Con el propósito de evaluar si los cambios de expresión se correlacionan con la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* se procedió a transfectar dos fragmentos del promotor de hCAT-1 (-1606 y -650 pb) en HUVEC normales y provenientes de embarazos con diabetes gestacional, en ausencia y presencia de insulina, agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A y/o IR-B. En HUVEC procedentes de embarazos normales, insulina aumenta la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en ambos constructos, efecto que desaparece en células *knock-down* para las isoformas A y B del receptor de insulina (IR-A e IR-B), los cuales además no fueron modificados en presencia de agonistas y/o antagonistas de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} (Figuras 53A,B; 54A,B).

Por otro lado, HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* está aumentada en ambos constructos, efecto bloqueado solo por ZM-241385 en células *knock-down* para IR-A e IR-B (Figura 56A,B). Ahora, si estas células son incubadas con insulina, el efecto de diabetes es revertido a valores cercanos a HUVEC normales sin insulina, efecto que fue bloqueado en presencia de DPCPX y CGS-21680 en células *knock-down* para IR-B en ambos constructos (Figuras 55B, 56B).

A



B

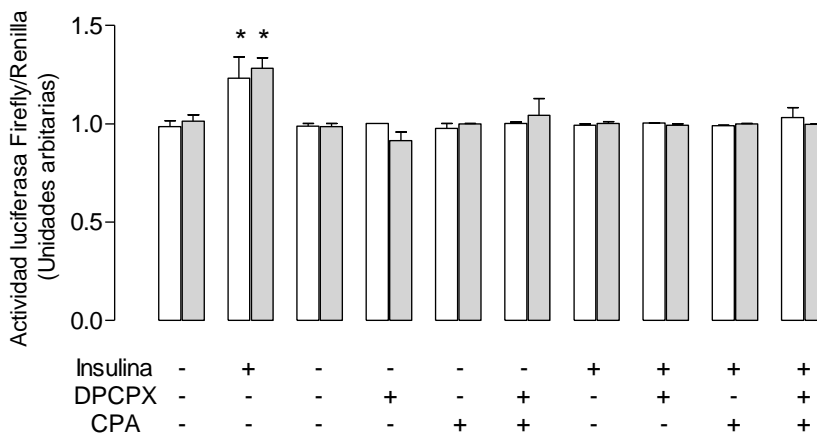


Figura 53. Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A₁ para aumentar la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en HUVEC normales. Células provenientes de embarazos normales fueron transfectadas con 2 fragmentos del promotor de *SLC7A1* (pGL3-hCAT-1⁻¹⁶⁰⁶ y pGL3-hCAT-1⁻⁶⁵⁰) insertados río arriba de reportero de *luciferasa firefly* (*luc*). La actividad luciferasa relativa (razón entre la actividad de luciferasa *firefly*/luciferasa *renilla*), fue determinada en lisado celular (48 post infección) en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), CPA (agonista de receptor de adenosina A₁, 30 nM), DPCPX (antagonista de receptor de adenosina A₁, 30 nM) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI), como se describe en los métodos. A y B corresponden células *knock-down* para IR-A e IR-B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=8. * P <0.05 con respecto al resto de las condiciones.

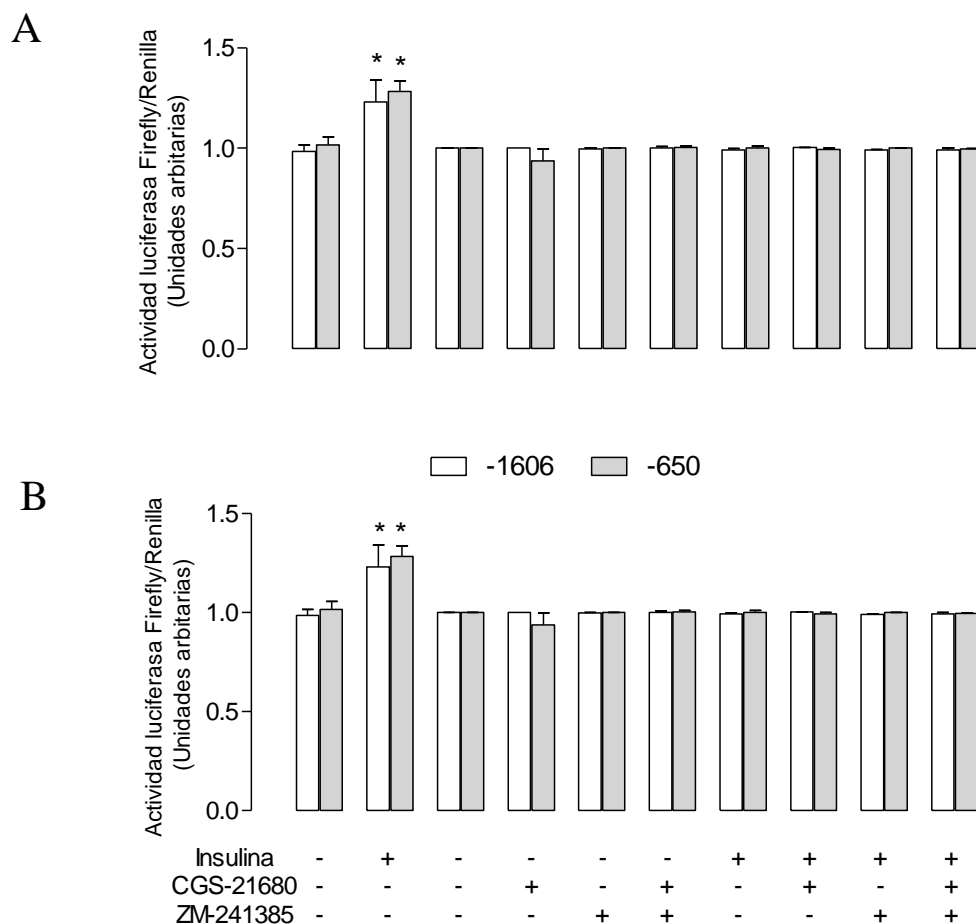


Figura 54. Insulina requiere de IR-A e IR-B, y no de receptores de adenosina A_{2A} para aumentar la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en HUVEC normales. Células provenientes de embarazos normales fueron transfectadas con 2 fragmentos del promotor de *SLC7A1* (pGL3-hCAT-1⁻¹⁶⁰⁶ y pGL3-hCAT-1⁻⁶⁵⁰) insertados río arriba de reportero de *luciferasa firefly* (*luc*). La actividad luciferasa relativa (razón entre la actividad de luciferasa *firefly*/luciferasa *renilla*), fue determinada en lisado celular (48 post infección) en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), CGS-21680 (agonista de receptor de adenosina A_{2A} , 30 nM), ZM-241385 (antagonista de receptor de adenosina A_{2A} , 10 nM) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI), como se describe en los métodos. A y B corresponden células *knock-down* para IR-A e IR-B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=8. * $P < 0.05$ con respecto al resto de las condiciones.

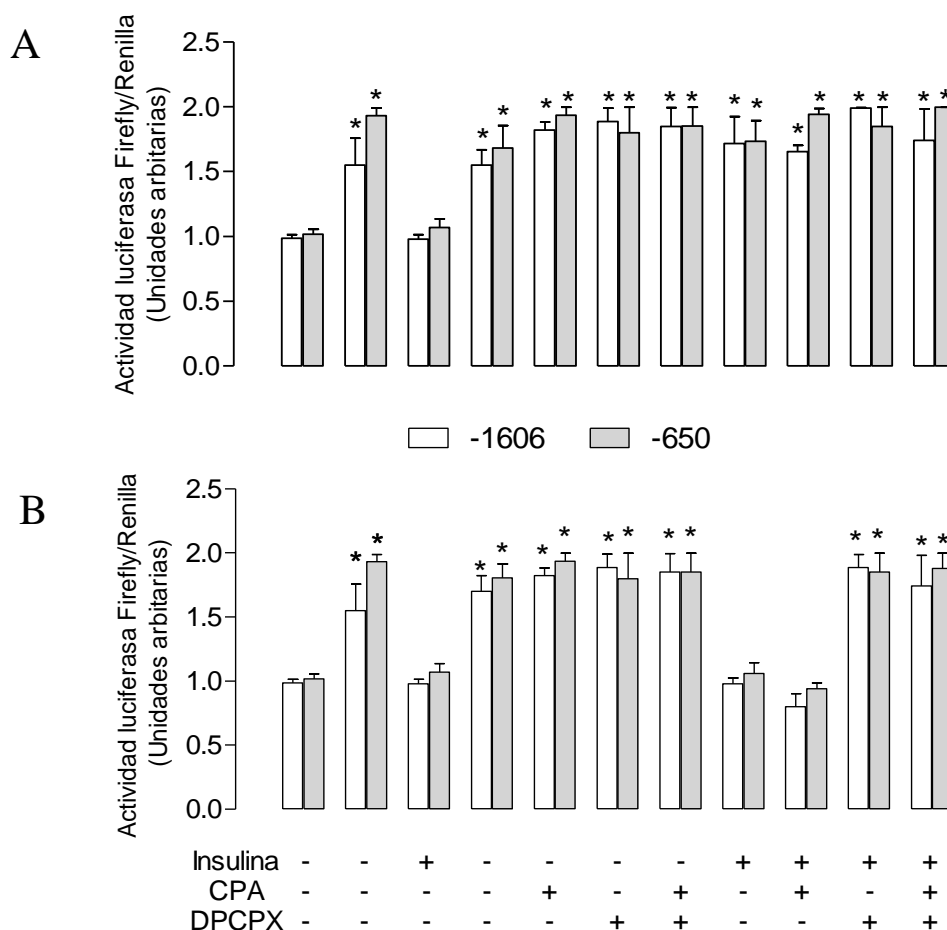


Figura 55. Insulina requiere de IR-A, y de receptores de adenosina A₁ para revertir el aumento de la actividad transcripcional del promotor *SLC7A1* en HUVEC con diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos con diabetes gestacional fueron transfectadas con 2 fragmentos del promotor de *SLC7A1* (pGL3-hCAT-1⁻¹⁶⁰⁶ y pGL3-hCAT-1⁻⁶⁵⁰) insertados río arriba de reportero de *luciferasa firefly* (*luc*). La actividad luciferasa relativa (razón entre la actividad de luciferasa *firefly*/luciferasa *renilla*), fue determinada en lisado celular (48 post infección) en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), CPA (agonista de receptor de adenosina A₁, 30 nM), DPCPX (antagonista de receptor de adenosina A₁, 30 nM) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI), como se describe en los métodos. A y B corresponden células *knock-down* para IR-A e IR-B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M., n=8. En A, **P*<0.05 con respecto a células controles normales y células con diabetes gestacional en presencia de insulina. En B, **P*<0.05 con respecto a células controles normales, células con diabetes gestacional en presencia de insulina, y células *knock-down* para IR-B en presencia de insulina y CPA.

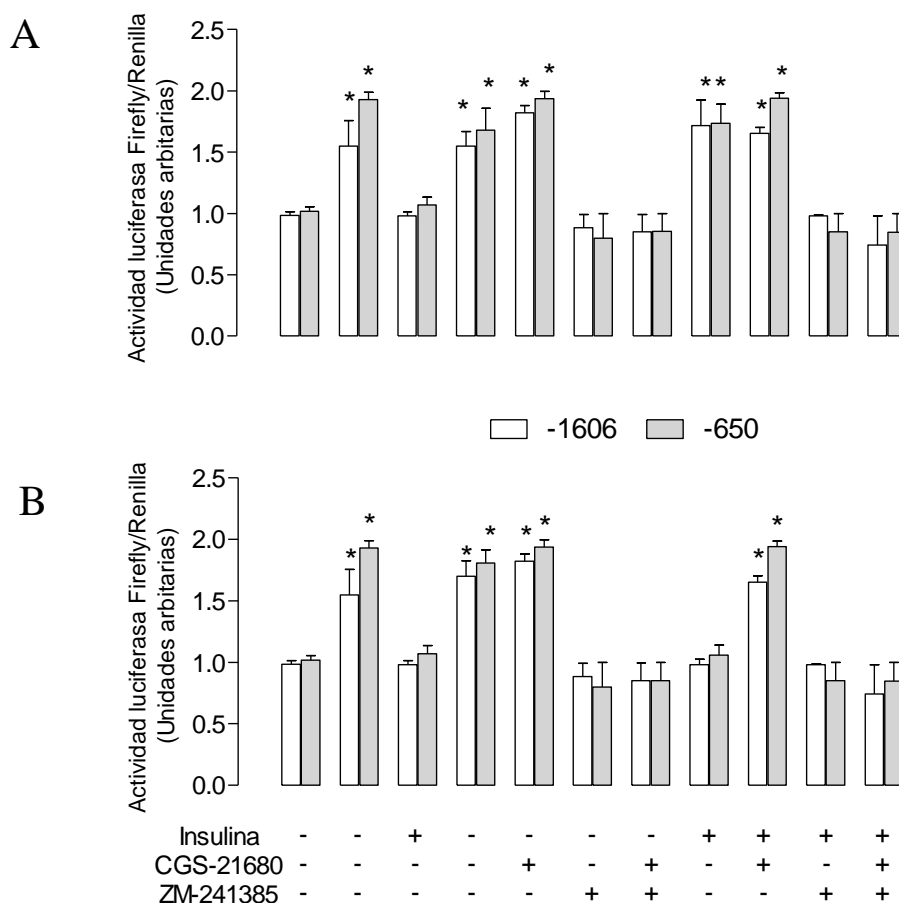


Figura 56. Insulina requiere de IR-A, y no de receptores de adenosina A_{2A} para revertir el aumento de la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* en HUVEC con diabetes gestacional. Células provenientes de embarazos con diabetes gestacional fueron transfectadas con 2 fragmentos del promotor de *SLC7A1* (pGL3-hCAT-1⁻¹⁶⁰⁶ y pGL3-hCAT-1⁻⁶⁵⁰) insertados río arriba de reportero de *luciferasa firefly* (*luc*). La actividad luciferasa relativa (razón entre la actividad de luciferasa *firefly*/luciferasa *renilla*), fue determinada en lisado celular (48 post infección) en ausencia (-) y presencia (+) de insulina (1 nM, 8 horas), CGS-21680 (agonista de receptor de adenosina A_{2A} , 30 nM), ZM-241385 (antagonista de receptor de adenosina A_{2A} , 10 nM) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (Ad-IR-A, 100 MOI), o IR-B (Ad-IR-B, 100 MOI), como se describe en los métodos. A y B corresponden células *knock-down* para IR-A e IR-B, respectivamente. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=8. En A, * P <0.05 con respecto a células controles normales, células controles con diabetes gestacional en presencia de insulina, y células *knock-down* para IR-A en presencia de ZM-241385. En B, * P <0.05 con respecto a células controles normales, células controles con diabetes gestacional en presencia de insulina, y células *knock-down* para IR-B en presencia de insulina y ZM-241385, excepto insulina en presencia de CGS-21680.

5.24 Efecto de diabetes gestacional sobre la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1* en HUVEC.

En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional muestran mayor unión del factor transcripcional Sp1 al promotor de *SLC7A1*, efecto que fue bloqueado por insulina, volviendo a valores observados en HUVEC normales (Figura 57).

5.25 Participación de IR-A e IR-B en la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1* en HUVEC.

La unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1* aumentado por insulina en HUVEC normales es revertido en células *knock-down* para las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina (Figura 58A). Sin embargo, el efecto de insulina también fue bloqueado al utilizar ZM-241385 (antagonista de receptores de adenosina A_{2A}), el cual no se modificó en células *knock-down* para IR-A e IR-B (Figura 58B).

En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, insulina revierte el efecto de diabetes gestacional (ver Figura 57). Este efecto sobre la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*, fue revertido sólo en células *knock-down* para IR-A (Figura 59A). De manera interesante, el efecto de insulina fue bloqueado al utilizar DPCPX (antagonista de receptores de adenosina A₁), el cual no se modificó en células *knock-down* para IR-A e IR-B (Figura 59B).

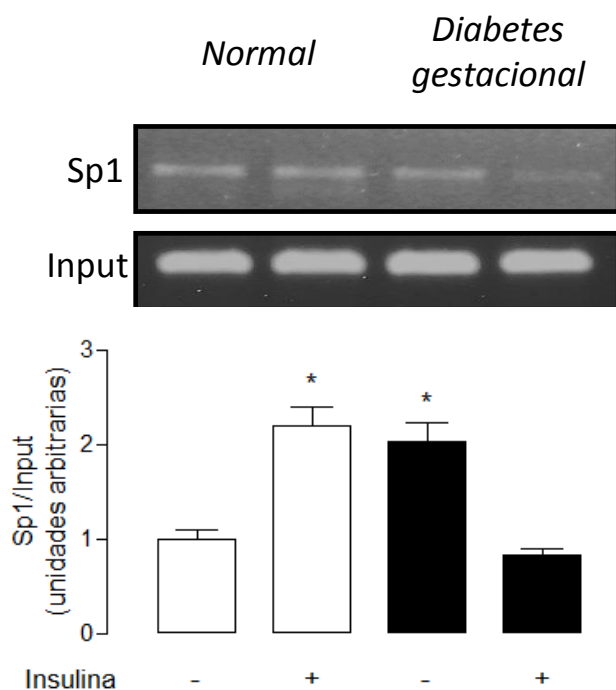


Figura 57. Insulina revierte el aumento en la unión de Sp1 a su elemento de respuesta en el promotor de hCAT-1 en HUVEC de diabetes gestacional. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP) representativo para la unión de Sp1 al DNA de HUVEC normales (barras blancas) o de diabetes gestacional (barras negras) en ausencia y presencia de insulina (1 nM, 8 horas) como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=3. *P<0.05 con respecto a células normales contrales y provenientes de embarazos con diabetes gestacional en presencia de insulina.

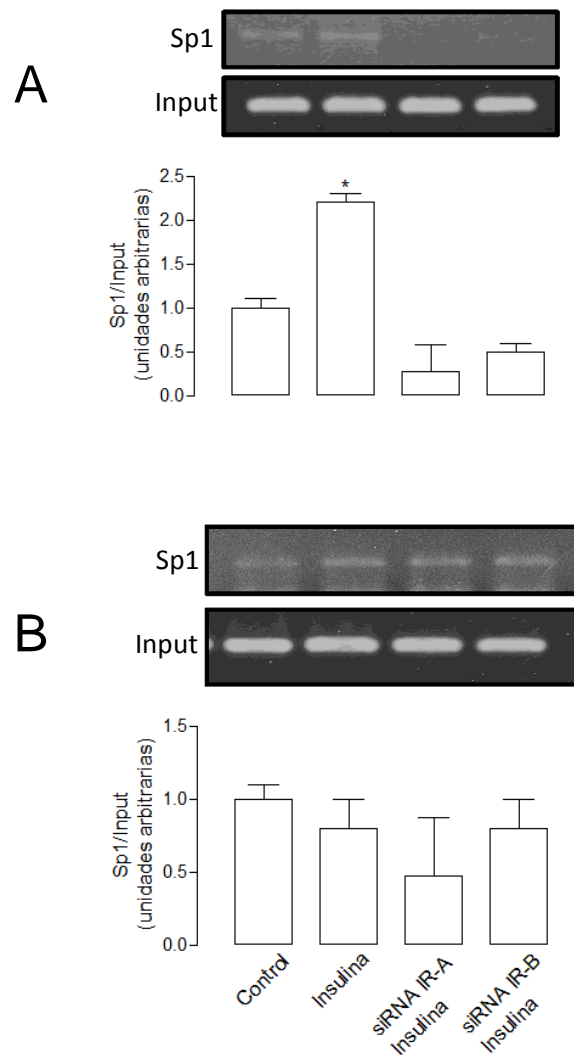


Figura 58. Insulina requiere de IR-A e IR-B, y de receptores de adenosina A_{2A} para aumentar la unión de Sp1 a su elemento de respuesta en el promotor de hCAT-1 en HUVEC normales. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP) representativo para la unión de Sp1 al DNA de HUVEC normales en ausencia (A) y presencia (B) de ZM-241385 (10 nM, 8 horas). HUVEC normales fueron incubadas en ausencia y presencia de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (100 MOI) o IR-B (100 MOI) como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=3. *P<0.05 con respecto al resto de condiciones.

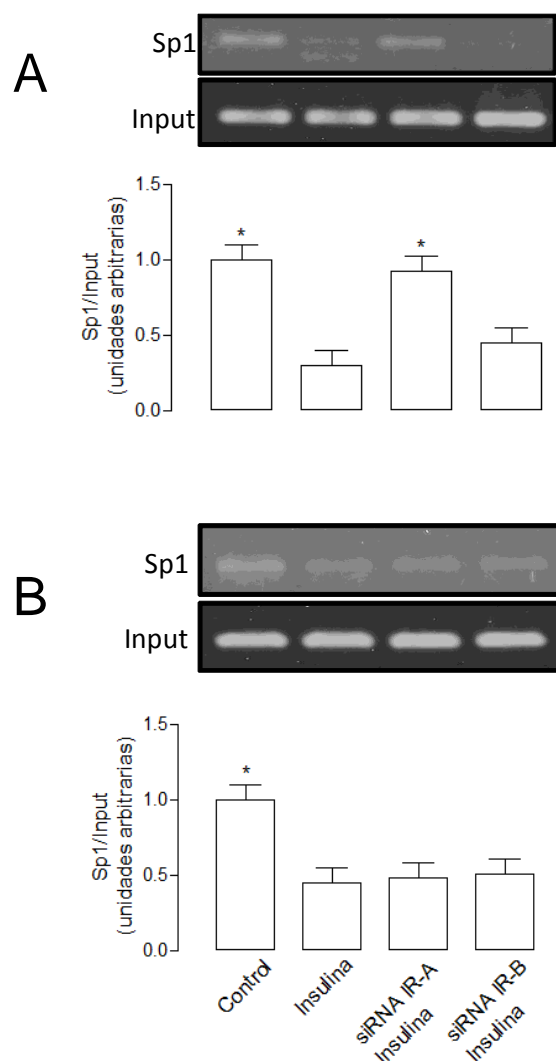


Figura 59. Insulina requiere de IR-A y de receptores de adenosina A₁ para revertir el aumento de la unión de Sp1 a su elemento de respuesta en el promotor de hCAT-1 en HUVEC con diabetes gestacional. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP) representativo para la unión de Sp1 al DNA de HUVEC con diabetes gestacional en ausencia (A) y presencia (B) de DPCPX (30 nM, 8 horas). HUVEC con diabetes gestacional fueron incubadas en ausencia y presencia de insulina (1 nM, 8 horas) y/o adenovirus portadores de siRNA contra IR-A (100 MOI) o IR-B (100 MOI) como se describe en los métodos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M., n=3. En A, * P <0.05 con respecto a insulina y células *knock-down* para IR-B en presencia de insulina. En B, * P <0.05 con respecto al resto de las condiciones.

6. DISCUSION

Diabetes gestacional es una patología del embarazo que se caracteriza por intolerancia a la glucosa materna y disfunción endotelial feto-placentaria (Sobrevia y cols., 2011). En este contexto se ha observado que en la macrocirculación de la placenta existe un aumento en el transporte del aminoácido semi-esencial L-arginina y de la síntesis de NO (i.e., ruta L-arginina/NO). Mediciones realizadas en sangre de cordón umbilical muestran la presencia de altos niveles de insulina y adenosina, sugiriendo su participación en este fenómeno (Westermeier y cols., 2011). En efecto, se ha demostrado que insulina y adenosina aumentan la ruta L-arginina/NO en HUVEC provenientes de embarazos normales (Sobrevia y cols., 1997; Vásquez y cols., 2004; González y cols., 2004; 2011; Westermeier y cols., 2011). Sin embargo, insulina, revierte el aumento de la ruta L-arginina/NO en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional (Sobrevia y cols., 1997; Westermeier y cols., 2011). Esta dualidad, podría ser debido a una expresión y señalización diferencial de las isoformas A (IR-A) y B (IR-B) del receptor de insulina, puesto que se ha observado que HUVEC expresan ambas isoformas del receptor de insulina, y HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional presentan un aumento en la expresión de IR-A, y mayor actividad de p42/44mapk (Westermeier y cols., 2011; 2013). Además, se ha propuesto que el fenotipo de diabetes gestacional en el endotelio fetal de la macrocirculación, podría ser debido a una activación persistente de receptores de adenosina A_{2A} , generando el aumento de la ruta L-arginina/NO (Vásquez y cols., 2004; San Martín & Sobrevia, 2006). Pero se ha descrito que los efectos biológicos de insulina son regulados por la activación de receptores de adenosina (Guzmán-Gutiérrez y cols., 2011; 2013), y dado a que insulina posee efectos benéficos sobre el endotelio fetal

provenientes de embarazos con diabetes gestacional, es posible que adenosina esté jugando un rol en los efectos biológicos de insulina, incluyendo la ruta L-arginina/NO.

En este estudio se demuestra que la mayor actividad del transporte de L-arginina es mediado por hCAT-1, detectado en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, un efecto que fue revertido por insulina a través de la activación predominante de la isoforma A del receptor de insulina (IR-A). Estos resultados sugieren un rol protector de insulina en la fisiopatología de la diabetes gestacional en la macrocirculación de la placenta. Sin embargo, insulina aumenta el transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales, en donde la activación de ambas isoformas del receptor de insulina (IR-A e IR-B) son requeridos. Estos antecedentes sugieren que una expresión adecuada de ambas isoformas permitiría mantener un fenotipo endotelial normal.

Por otro lado, el efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina en células HUVEC provenientes de embarazos normales es bloqueado por ZM-241385 (antagonista de receptores de adenosina A_{2A}), abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y de la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*. Estos resultados sugieren que la actividad de receptores de adenosina A_{2A} es requerida para el efecto de insulina. Esto podría ser explicado por una disminución en la unión del factor transcripcional Sp1 al promotor de *SLC7A1*, de forma que una inactivación del receptor de adenosina A_{2A} bloquee la señalización del receptor de insulina en estas células, efectos que no sufrieron modificaciones en células tratadas con el siRNA para IR-A o IR-B.

El efecto de insulina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional es bloqueado por DPCPX (antagonista de receptores de adenosina A_1), también a nivel del transporte de L-arginina, abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y de la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*. En diabetes

gestacional, a diferencia de las normales, insulina requiere de la actividad de receptores de adenosina A1, los cuales también son explicados por una mayor unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*, efectos que no sufrieron modificaciones en células tratadas con el siRNA para IR-B.

Los resultados de este estudio comprenden la primera evidencia disponible en relación a los efectos diferenciales de insulina modulados por receptores de adenosina en endotelio fetal humano de embarazos normales comparados con embarazos con diabetes gestacional. Así estos antecedentes contribuyen a esclarecer el rol de estas isoformas del receptor de insulina en la regulación del transporte de L-arginina en esta patología y del papel de los receptores de adenosina como moduladores de las acciones biológicas de insulina.

6.1 Diabetes gestacional

Diabetes gestacional es una patología que se asocia con intolerancia a la glucosa materna (Metzger y cols., 2007) la cual se asocia a resistencia a la insulina y macrosomía como riesgos perinatales (Herrera & Ortega-Senovilla, 2010). Este estudio muestra que en sangre de madres que cursan con diabetes gestacional hay cambios en los niveles de hemoglobina glicosilada (indicador del promedio de la glicemia postprandial), en la glicemia post carga de glucosa y los niveles de insulina plasmática en ayunas, los cuales se traducen en un aumento de 1.6 veces en el HOMA-IR con respecto a las madres normales, o una disminución ~40% en el HOMA-IS, y una aumento cercano al 15% en la función de las células β pancreáticas. Por lo tanto, las madres que cursaron con diabetes gestacional presentan resistencia a la insulina. Sin embargo, estos efectos fueron más notorios en los recién nacidos, en donde el índice HOMA-IR aumentó en 2.3 veces, y el HOMA-IS

disminuyó en casi un 60%, indicando que el feto, en el momento del parto también cursa con resistencia a la insulina. Estos datos se correlacionan con lo observado por Wang y cols. (2013) en donde el HOMA-IR en las madres y en los recién nacidos aumenta en 1.5 y 2.0 veces, respectivamente. Al comparar la relación $\text{HOMA-IR}_{\text{materno}}/\text{HOMA-IR}_{\text{fetal}}$ entre los grupos normal (1.12 ± 0.1) y diabetes gestacional (0.77 ± 0.07) se observa que en la patología disminuye alrededor de un 40%, por un aumento en el $\text{HOMA-IR}_{\text{fetal}}$. Esto podría indicarnos que en la patología de diabetes gestacional existe resistencia a la insulina que es mayor en el feto en comparación a la madre. Esta observación es comparable con lo observado en los datos de Wang y cols. (2013), en donde el grupo con diabetes gestacional presenta una disminución de un 20% en la relación $\text{HOMA-IR}_{\text{materno}}/\text{HOMA-IR}_{\text{fetal}}$, también generada por un aumento en $\text{HOMA-IR}_{\text{fetal}}$. Además, se ha correlacionado de manera positiva el índice HOMA-IR en fetos de término con el diámetro de la aorta abdominal antero-posterior (Ciccone y cols., 2013), donde los autores plantean que la insulinoresistencia fetal podría generar mayor daño en la pared arterial, acelerando los procesos ateroscleróticos en el futuro.

Es interesante destacar que los recién nacidos de madres que padecieron diabetes gestacional mostraron un aumento tanto en el peso al nacer como en el índice ponderal respecto a recién nacidos de madres diagnosticadas con embarazos normales. Se ha establecido una correlación entre el aumento en el nivel de la hemoglobina glicosilada (determinado durante el primer trimestre de embarazo) como potencial factor de riesgo de diabetes gestacional, macrosomía y de presentar intolerancia post-parto a la glucosa (Katon y cols., 2011). Así, diabetes gestacional cursa con alteraciones en la homeostasis de D-glucosa y con crecimiento fetal anormal, estableciéndose además que los hijos de madres diagnosticadas con diabetes gestacional presentan un mayor riesgo de cursar con obesidad,

intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 durante la vida adulta (Pinney y Simmons, 2012).

6.2 Efecto de diabetes gestacional sobre el transporte de L-arginina

Desde los primeros estudios sobre el transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos normales y con diabetes gestacional (Sobrevia y cols., 1995; 1996) existe evidencia concluyente que asocia este síndrome con mayor expresión y actividad de transporte de L-arginina (Vásquez y cols., 2004). En este contexto, los resultados de este estudio confirman que la captación de L-arginina desde el medio extracelular es mayor en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional comparadas con células de embarazos normales. Estos antecedentes complementan estudios previos (Sobrevia y cols., 1995; 1996; 1998; Vásquez y cols., 2004) en donde se observa que la V_{max} y la V_{max}/K_m aumentan ~ 4 y ~ 3 veces, respectivamente. Esto se correlaciona con otros estudios, en los cuales se observa que en esta patología existe un aumento en la síntesis de óxido nítrico (NO) (Farías y cols., 2006; 2010; Westermeier y cols., 2011), lo cual sugiere que el aumento del transporte de L-arginina se asocia con un aumento en la síntesis de NO, lo cual se conoce como ruta L-arginina/NO (Wyatt y cols., 2004). Lo interesante es que en otras patologías del embarazo, como son la preeclampsia y la restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) se observa una disminución de esta ruta en HUVEC (Casanello y cols., 2009; Pimentel y cols., 2013), lo cual nos permite reconocer que las alteraciones a nivel del transporte de L-arginina o de la síntesis de NO son importantes, para comprender la etiología de esta patología.

6.3 Efecto de diabetes gestacional sobre la expresión de hCAT-1

Al analizar la abundancia de proteína como el nivel de mRNA que codifica para hCAT-1 se observó un aumento en estos parámetros en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional respecto a células normales, lo cual sugiere que el aumento del transporte de L-arginina observado en estas células podría deberse al aumento de la expresión de este transportador. Esto también se correlaciona con la K_m aparente observada en estas células para el transporte de L-arginina ($\sim 100 \mu\text{M}$) con el transportador hCAT-1 (Speake y cols., 2003; Rotmann y cols., 2004; González y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012), puesto que otros transportadores de L-arginina en estas células como hCAT-2B o el sistema y^+L muestran valores de $K_m \sim 20$ y $\sim 300 \mu\text{M}$, respectivamente (Casanello & Sobrevia, 2002; Flores y cols., 2003; Sala y cols., 2002; Arancibia-Garavilla y cols., 2003). Estos aumentos también han sido observados en condiciones como hiperglicemia (Vásquez y cols., 2007), condición observada en diabetes gestacional (Yener y cols., 2007).

Para comprobar que estos cambios en la abundancia de proteína y niveles de mRNA se asocian con una mayor actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*, se procedió a evaluar con dos fragmentos de este promotor (1606 y 650 pb desde el inicio de la transcripción), donde se observó que existe un aumento de la actividad transcripcional de este promotor en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, . Esto se correlaciona con un aumento en la unión del factor transcripcional proteína específica 1 (Sp1) en una región consenso entre -177 y +105 del promotor de *SLC7A1*. Por lo tanto, es posible decir que en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional aumenta

la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*, el cual aumenta la actividad transcripcional del promotor, los niveles del mRNA y la abundancia de proteína de hCAT-1, lo que se traduciría en un aumento en el transporte de L-arginina (ver Figura 60). Se ha demostrado en otros trabajos que Sp1 aumenta la actividad transcripcional en el promotor de *SLC29A1* (para hENT-1) en presencia de alta glucosa (25 mM) (Puebla y cols., 2008) y TGF β (Vega y cols., 2009) en HUVEC, elementos que se encuentran involucrados en la patología de diabetes gestacional. Así en otros modelos celulares, se ha observado que la hiperglicemia aumenta la actividad Sp1, disminuyendo la expresión de receptores scavenger hepático en células HepG2 (Murao y cols., 2008).

6.4 Efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina en diabetes gestacional.

Una de las características de la patología de diabetes gestacional, es cursar con hiperinsulinemia materna y fetal (Salomón y cols., 2012). Se ha observado en diferentes trabajos que placentas provenientes de embarazos con diabetes gestacional, muestran cambios en la expresión de diferentes proteínas entre los cuales muchos de ellos se asocian a algún defecto de la señalización del receptor de insulina (Liu y cols., 2012; Salómon y cols., 2012; Hiden y cols., 2012; Pérez-Perez y cols., 2013). En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional, insulina recupera la V_{\max} del transporte de L-arginina parcialmente a valores observados en HUVEC provenientes de embarazos normales en ausencia de insulina; sin embargo, la relación V_{\max}/K_m se recupera completamente a valores normales, complementando los datos ya observados en trabajos previos (Sobrevia y cols., 1998). Este efecto de recuperación a valores normales se complementa con los

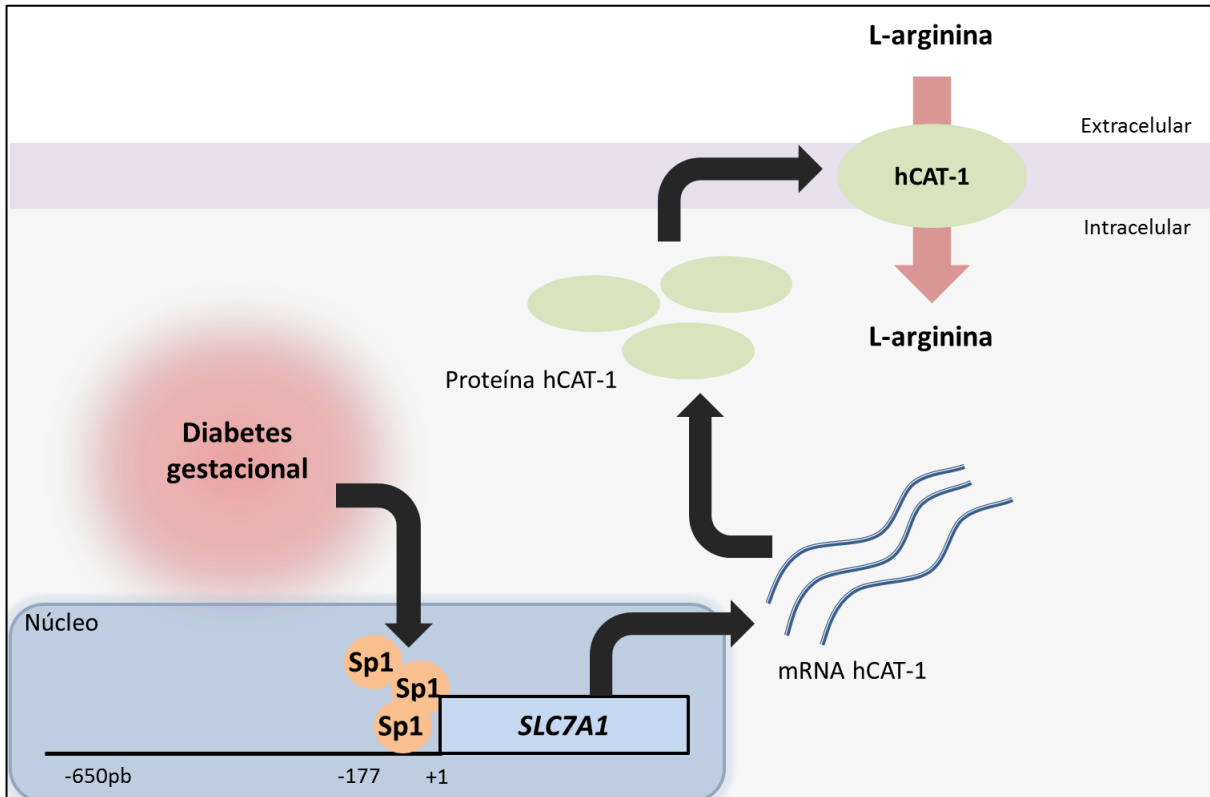


Figura 60. Modelo propuesto del efecto de diabetes gestacional sobre la expresión y actividad de hCAT-1. HUVEC de diabetes gestacional exhiben una mayor unión del factor transcripcional Sp1, al promotor de *SLC7A1* (para hCAT-1), en una zona consenso que contiene 4 sitios para Sp1 (entre -177 y +1 pb desde el inicio de la transcripción), aumentando la actividad transcripcional del promotor *SLC7A1* en el fragmento entre -650 pb y el inicio de la transcripción. Estos cambios aumentarían los niveles de mRNA, y la abundancia de proteína para hCAT-1, y la actividad de transporte de L-arginina.

datos observados por Westermeier y cols. (2011), donde se observó que en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional insulina recupera a valores normales los niveles de transporte de adenosina. Es interesante mencionar que este efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional se pierde en condiciones de alta glucosa (25 mM) que es característico de esta patología. A diferencia de lo anterior, insulina aumenta la V_{\max} y la V_{\max}/K_m en HUVEC provenientes de embarazos normales. Este resultado complementa otros ya informados en la literatura (Sobrevia y cols., 1997; González y cols., 2004; 2011; Vásquez y cols., 2007).

6.5 Efecto de insulina en la expresión de hCAT-1 en diabetes gestacional.

Similar a lo observado en el transporte de L-arginina, insulina disminuyó la abundancia de proteína, nivel de mRNA y actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1* (en ambos fragmentos -1606 y -650 pb desde el inicio de la transcripción) en HUVEC de diabetes gestacional a valores observados en HUVEC normales. Además, el factor de transcripción Sp1, que participa en los genes deficientes de caja TATA como es *SLC7A1*, aumenta su unión al promotor de *SLC7A1* y se recupera a valores controles. Se ha observado que en un ratón db-/db-, deficiente de leptina (modelo de diabetes tipo 2) existe una disminución de la abundancia de Sp1 en células endoteliales de corazón (Kassan y cols., 2013). Además, se ha visto que en la línea celular de músculo esquelético L6 que insulina induce la expresión de PKC δ por un mecanismo dependiente de Sp1 (Horovitz-Fried y cols., 2007). Pero en HUVEC normales expuestas a alta D-glucosa, existe un aumento de la proteína Sp1 a nivel nuclear, el cual se correlacionó con mayor unión al promotor de *SLC29A1* (para hENT-1) (Puebla y cols., 2008). Estos antecedentes asientan la posibilidad que Sp1 podría estar involucrado en la patología de diabetes gestacional, y sugiere que insulina

disminuye a valores normales el transporte de L-arginina por una normalización de la unión del factor transcripcional Sp1 al promotor de *SLC7A1*, recuperando los valores de actividad transcripcional, los niveles de mRNA y la abundancia de proteína a valores normales (Figura 61). Sin embargo, en HUVEC provenientes de embarazos normales se observó, como ya se había visto en el transporte de L-arginina, que insulina aumentó la abundancia de proteína, los niveles de mRNA, la actividad de transcripcional del promotor de *SLC7A1* y la unión del factor transcripcional Sp1. Como ha sido publicado para este promotor (González y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012), Sp1 generaría estos cambios en HUVEC normales.

Se han identificado diversos elementos de respuesta a insulina (Hatzoglou y cols., 2004; Sobrevia & González, 2009). Se ha reportado que un aumento de Sp1 en el primer intrón de *SLC7A1* puede jugar un rol bifuncional en la actividad transcripcional de *SLC7A1*, es decir, aumentando la actividad transcripcional de *SLC7A1* seguido por la unión de la proteína unidora A al elemento rico en purinas (Pur alpha) bajo condiciones basales y en condiciones de estrés del retículo por el factor de transcripción activado 4 (ATF4), o disminuyendo la actividad transcripcional de *SLC7A1* por la proteína homóloga C/EBP (CHOP) en células de glioma de rata C6 (Huang y cols., 2009). Esto nos permite sugerir que, además de los efectos transcripcionales ya mencionados, insulina también pueda generar cambios post-traduccionales a nivel de la estabilidad de la proteína y/o del mRNA para hCAT-1.

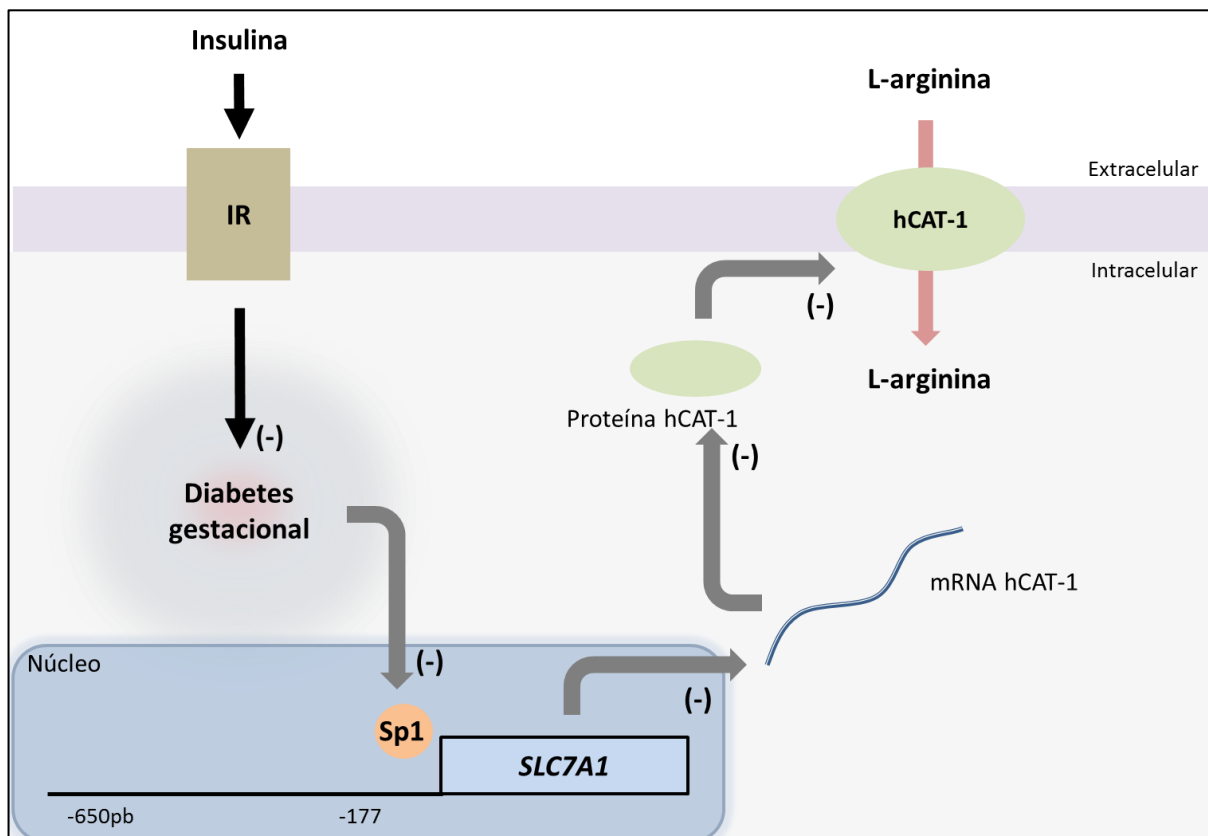


Figura 61. Modelo propuesto del efecto de insulina sobre la expresión y actividad de hCAT-1 en diabetes gestacional. Insulina, por la activación del receptor de insulina revierte (-) el efecto de diabetes gestacional, disminuyendo la unión (flechas grises) del factor transcripcional Sp1, al promotor de *SLC7A1* (para hCAT-1), en una zona consenso que contiene 4 sitios para Sp1 (entre -177 y +1 pb desde el inicio de la transcripción), disminuyendo la actividad transcripcional del promotor *SLC7A1* en el fragmento entre -650 pb y el inicio de la transcripción. Estos cambios disminuirían los niveles de mRNA, y la abundancia de proteína para hCAT-1, y la actividad de transporte de L-arginina.

6.6 Participación de las isoformas A y B del receptor de insulina en el transporte de L-arginina

La expresión del receptor de insulina en la placenta está aumentada en comparación con otros tejidos en el ser humano, experimentando cambios a lo largo del embarazo (Hiden y cols., 2009). En el primer trimestre del embarazo, el receptor de insulina (IR) se expresa principalmente en el trofoblasto, mientras que al término del embarazo se localiza principalmente en el endotelio. Así el cambio de la expresión de IR desde el trofoblasto al endotelio se asocia directamente a cambios en el control y regulación por insulina desde la madre al feto (Jones y cols., 1993; Desoye y cols., 1994; Hiden y cols., 2006, 2009).

Se ha descrito en diversos tejidos, humanos y de animales, la existencia de dos isoformas del IR, denominados IR-A e IR-B (Ebina y cols., 1985; Ulrich y cols., 1985) las cuales activan diferentes vías de señalización (Belfiore y cols., 2009). Debido a que en cultivos de HUVEC de embarazos normales y de diabetes gestacional no se observó diferencias significativas en la abundancia de la subunidad β de IR (β -IR) (Westermeyer y cols., 2013), sí se observó un aumento en la fosforilación en Tyr1361 de β -IR en ambos tipos celulares. Sin embargo, en HUVEC de embarazos normales se encontró una mayor expresión del mRNA que codifica para la IR-A respecto a IR-B (IR-A/IR-B \sim 1.7 veces), razón que es mayor en diabetes gestacional (IR-A/IR-B \sim 2.9 veces) (Westermeyer y cols., 2011). Así, se sugiere que diabetes gestacional podría estar asociada con una menor respuesta a insulina. Interesantemente, IR-A es predominante en enfermedades asociadas a resistencia a insulina como DMT2 (Norgren y cols., 1994) y distrofia miotónica tipo 1 (Savkur y cols., 2001), sugiriendo que este subtipo de receptores de insulina podría estar involucrado en HUVEC de diabetes gestacional.

Los resultados de este estudio sugieren que la mayor capacidad de transporte, el aumento de la abundancia de proteína, la expresión del mRNA, la actividad transcripcional del promotor *SLC7A1* para hCAT-1 y el aumento en la unión de Sp1 a este promotor podrían correlacionarse con una mayor expresión de IR-A en HUVEC de diabetes gestacional. No obstante, insulina restableció la expresión de esta isoforma a nivel cercano a los observado en células normales en ausencia de esta hormona (Westermeier y cols., 2011), con el mismo patrón que fue descrito para la recuperación del transporte de L-arginina. Esto apoya la idea que una expresión adecuada de IR-A sea requerida para mantener la actividad normal del transporte de L-arginina en HUVEC.

Se ha descrito que IR-A es la isoforma predominante en tejido fetal (Frasca y cols., 1999). En humanos, insulina actúa predominantemente como un factor de crecimiento, lo cual se ha propuesto por estudios realizados en primates donde la administración de insulina a la circulación fetal se correlacionó con aumento de tamaño placentario (Susa y cols., 1984), un efecto similar al observado en placentas de madres con niveles elevados de insulina plasmática (Godfrey y cols., 1996). Por lo tanto, la expresión mayoritaria de IR-A plantea la posibilidad de que esta isoforma se asocie a crecimiento, sobrevivencia y diferenciación celular en tejido fetal (Belfiore & Malaguarnera, 2011). Por otra parte, es interesante mencionar publicaciones que asocian IR-A y tejido canceroso humano derivado de mama, pulmón, colon y músculo esquelético (Frasca y cols., 1999; Sciacca y cols., 1999), ovario (Kalli y cols., 2002), tiroide (Vella y cols., 2002), tejido hepático (Chettouh y cols., 2013) y endometrio (Wang y cols., 2013).

Nuestros resultados muestran que el efecto de insulina en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional sobre la V_{\max} del transporte de L-arginina fue bloqueado en células knock-down para IR-A; sin embargo, en la capacidad de transporte

(V_{\max}/K_m), fue bloqueado solo de manera parcial (60%). Una explicación a este efecto, es que el valor de K_m aparente esté aumentado en esta condición, si bien no existen modificaciones post-traduccionales descritos para hCAT-1, no se puede descartar que IR-A genere cambios a nivel estructural de la proteína. Estos datos se correlacionan con los resultados observados por Westermeier y colaboradores (2013), quienes observaron que la recuperación del transporte de adenosina en diabetes gestacional también fue mediado por la misma isoforma, reafirmando la idea que IR-A es un elemento importante en esta patología. De manera interesante, este efecto también fue observado a nivel de la abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*, indicando que la activación de IR-A, y no de IR-B, modula la actividad y la expresión de hCAT-1 en HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional. De manera importante, estos datos también se correlacionan con la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*. Por lo tanto, IR-A envía una señal intracelular para disminuir la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*, normalizando la actividad transcripcional, los niveles de mRNA, la abundancia de proteína y la capacidad transporte para L-arginina (Figura 62).

Sin embargo, en HUVEC provenientes de embarazos normales, el efecto de insulina requiere de ambas isoformas, puesto que células knock-down para IR-A e IR-B, perdieron el efecto de insulina a nivel de la V_{\max} , V_{\max}/K_m , la abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y la actividad transcripcional de *SLC7A1*. En donde el factor transcripcional Sp1, es activado por ambas isoformas (IR-A e IR-B). Cabe destacar que este trabajo muestra los primeros hallazgos en relacionar las isoformas del receptor de insulina y la unión del factor transcripcional Sp1, y sus potenciales efectos en el transporte de L-arginina en endotelio fetal humano en diabetes gestacional.

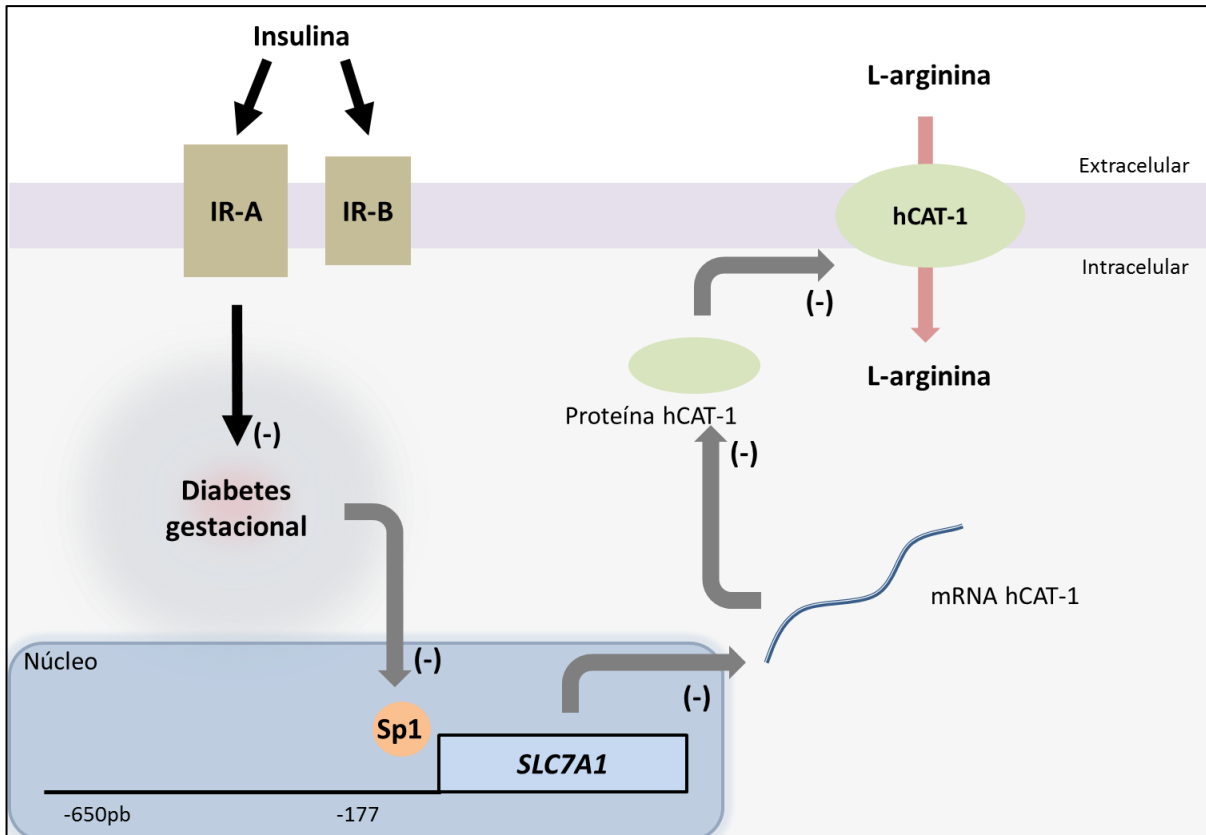


Figura 62. Modelo propuesto del efecto de insulina vía IR-A sobre la expresión y actividad de hCAT-1 en diabetes gestacional. Insulina, por la activación de la isoforma A del receptor de insulina (IR-A) revierte (-) el efecto de diabetes gestacional, disminuyendo la unión (flechas grises) del factor transcripcional Sp1, al promotor de *SLC7A1* (para hCAT-1), en una zona consenso que contiene 4 sitios para Sp1 (entre -177 y +1 pb desde el inicio de la transcripción), disminuyendo la actividad transcripcional del promotor *SLC7A1* en el fragmento entre -650 pb y el inicio de la transcripción. Estos cambios disminuirían los niveles de mRNA, y la abundancia de proteína para hCAT-1, y la actividad de transporte de L-arginina.

6.7 Efecto de los receptores de adenosina sobre el efecto de diabetes gestacional.

Adenosina es un nucleósido endógeno el cual está aumentado en diferentes patologías del embarazo, como preeclampsia (Espinoza y cols., 2012) y diabetes gestacional (Westermeier y cols., 2011). De hecho se ha propuesto como mecanismo de señalización la ruta ALANO (Adenosine-L-Arginine-Nitric Óxide) (San Martín & Sobrevia, 2006). El aumento de la concentración extracelular de adenosina en diabetes gestacional, producto de una disminución del transporte de adenosina en HUVEC (Sobrevia y cols., 1995; Vásquez y cols., 2004; Aguayo y cols., 2005; Farias y cols., 2006; 2010; Puebla y cols., 2008; Westermeier y cols., 2010; 2013), activa receptores de adenosina A_{2A} , los cuales aumenta la actividad del transporte de L-arginina, de la eNOS y finalmente los niveles de NO (Vásquez y cols., 2004). Se ha propuesto que la ruta ALANO está activa en células HUVEC provenientes de diabetes gestacional (San Martín & Sobrevia, 2006; Sobrevia y cols., 2011; Guzmán-Gutiérrez y cols., 2013). HUVEC expresan los cuatro tipos de receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3) (Feoktistov y cols., 2002; Wyatt y cols., 2002). Sin embargo, el receptor de adenosina A_{2A} es quien tiene mayores efectos vasculares en humanos (Fredholm y cols., 2011).

Este estudio evaluó a nivel del transporte de L-arginina la actividad de los cuatro receptores de adenosina, quienes en ausencia de insulina no mostraron cambios en HUVEC normales. Esto podría ser contradictorio, puesto que Vásquez y cols., (2004) observaron que al activar estas mismas células con CGS-21680 (agonista del receptor de adenosina A_{2A}), pero en tiempos cortos (2 minutos), observaron un aumento en el transporte de L-arginina. Probablemente, como en este estudio se evaluó a 8 horas de incubación, es probable que haya ocurrido una desensibilización de este receptor de adenosina (Fredholm y cols., 2001; 2011). Por otro lado, en HUVEC provenientes de

embarazos con diabetes gestacional, el aumento del transporte de L-arginina fue revertido en presencia de ZM-241385 (antagonista del receptor de adenosina A_{2A}), lo cual sugiere que en estas células la activación del receptor de adenosina A_{2A} potencia el aumento del transporte de L-arginina en diabetes gestacional, como ha sido planteado anteriormente (Vásquez y cols., 2004; San Martín & Sobrevia, 2006). De manera interesante, los receptores A_1 , A_{2B} y A_3 , no generaron cambios en el transporte de L-arginina en HUVEC normales y con diabetes gestacional en ausencia de insulina. Además, los efectos de los receptores de adenosina no fueron modificados en células *knock-down* para IR-A y/o IR-B, en ausencia de insulina, sugiriendo que estos receptores no participan en regular los efectos biológicos del transporte de L-arginina. Sin embargo, esto no descarta su participación en otros procesos biológicos importantes a nivel celular como la proliferación (Escudero y cols., 2013; Jackson & Gillespie, 2013) o la diferenciación celular (Fernández y cols., 2011).

6.8 Efecto de los receptores de adenosina y de insulina en diabetes gestacional.

Como se ha indicado, en HUVEC provenientes de diabetes gestacional insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina, la expresión de hCAT-1 y la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1* generado por esta patología, el cual fue bloqueado totalmente a nivel de la V_{max} y en la relación V_{max}/K_m del transporte de L-arginina en presencia del antagonista DPCPX (antagonista del receptor de adenosina A_1). Una explicación para este fenómeno podría ser que el receptor de adenosina A_1 participa en el metabolismo de la glucosa y en la homeostasis energética celular, esto último basado en que se ha observado que células β pancreáticas de rata pierden su oscilación en la secreción de insulina en ausencia de este receptor (Zywert y cols., 2011; Yang y cols., 2012). Además, ratones

knock-out para el receptor de adenosina A_1 muestran menor sensibilidad a insulina comparados a ratones wild-type (Faulhaber-Walter y cols., 2011). De hecho, se ha propuesto el uso del agonista CVT-3619 como un insulinosensibilizador en pacientes con DMT2 (Elzein & Zablocki, 2008). En otro modelo se ha observado que el transporte de glucosa estimulado por insulina fue aumentado por CPA (agonista de receptores de adenosina A_1) y bloqueado en presencia de DPCPX en músculo soleo de rata (Thong y cols., 2007). En esta tesis no se observó que CPA aumentara el efecto de insulina sobre el transporte de L-arginina en HUVEC con diabetes gestacional. Es posible que esto se deba a que el efecto de insulina observado es el máximo a la concentración usada. Sin embargo, la activación de receptores de adenosina A_{2A} por CGS-21680 también bloqueó el efecto de insulina a nivel de la V_{max} y en la relación V_{max}/K_m del transporte de L-arginina en HUVEC con diabetes gestacional. De hecho, existen algunas evidencias que muestran que la activación de receptores de adenosina A_{2A} y A_1 , actúan disminuyendo y aumentando el efecto de insulina, respectivamente, en un modelo de oveja fetal (Maeda & Koos, 2009). Sin embargo, también es posible que CGS-21680 estimule la ruta ALANO (San Martín & Sobrevia, 2006), siendo un efecto mas potente que el de insulina. Los resultados obtenidos se correlacionaron con lo observado a nivel de la abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*.

Por otro lado, en HUVEC de embarazos normales, insulina aumentó la V_{max} y la relación V_{max}/K_m del transporte de L-arginina, efecto que fue bloqueado solo por ZM-241385 (antagonista de receptores de adenosina A_{2A}) (Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012), sin observarse cambios en presencia de agonistas y antagonistas de los otros receptores de adenosina. Los resultados obtenidos se correlacionaron con lo observado a nivel de la abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y la actividad transcripcional

del promotor de *SLC7A1*. Estos datos se correlacionan con lo observado en otros estudios, en donde se ha informado que insulina disminuye el transporte de adenosina (Muñoz y cols., 2006; Westermeier y cols., 2011; 2013), aumentando las concentraciones de adenosina extracelular. Por lo tanto, esta adenosina extracelular activaría receptores de adenosina A_{2A} (ruta ALANO), aumentando el transporte de L-arginina por insulina (Vásquez y cols., 2004; González y cols., 2011), por lo tanto el bloqueo del receptor de adenosina A_{2A} por ZM-241385, interrumpiría la señalización vía ruta ALANO (Guzmán-Gutiérrez y cols., 2012).

6.9 Efecto de los receptores de adenosina y de las isoformas del receptor de insulina en diabetes gestacional.

En HUVEC provenientes de embarazos con diabetes gestacional *knockdown* para la isoforma B del receptor de insulina (IR-B), mantuvieron el fenotipo en presencia de insulina en los parámetros cinéticos del transporte de L-arginina, la abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1, y la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*. Incluyendo su sensibilidad a DPCPX y CGS-21680. Por el otro lado, en HUVEC *knock-down* para IR-A, insulina no tuvo efecto, y solo se recuperó a valores normales en presencia de ZM-241385, sugiriendo que solo el efecto de diabetes gestacional fue bloqueado en estas células. Sin embargo, se entiende que si estas células están cursando con insulino resistencia, y solo se potenciaría su efecto en presencia de ZM-241385, indicaría que en estas células *knock-down* para IR-A, la actividad del receptor de adenosina A_{2A} actuaría disminuyendo la sensibilidad a insulina, como se había observado en fetos de oveja (Maeda & Koos, 2009). Los efectos anteriormente señalados también fueron observados a nivel de la abundancia de proteína y niveles de mRNA para hCAT-1 y

la actividad transcripcional del promotor de *SLC7A1*. Es interesante indicar que en células knock-down para IR-A en presencia de insulina, se bloqueó la unión de Sp1 al promotor de *SLC7A1*, indicando que la activación de la isoforma A del receptor de insulina disminuye la unión de Sp1 al DNA, recuperando a valores normales la actividad transcripcional, los niveles de mRNA y la abundancia de proteína para hCAT-1, y el transporte de L-arginina (Figura 63).

Por otro lado, en HUVEC provenientes de embarazos normales, el aumento del transporte de L-arginina por insulina fue bloqueado en células *knock-down* para IR-A y/o IR-B, este bloqueo del aumento del transporte de L-arginina no se recuperó por agonistas y antagonistas de receptores de adenosina. Sugiriendo que en esta condición insulina requiere la expresión de una u otra isoforma para generar su efecto biológico. De hecho la unión de Sp1 requiere de la activación de ambas isoformas del receptor de insulina, para aumentar la actividad transcripcional, los niveles de mRNA y la abundancia de proteína para hCAT-1, y el transporte de L-arginina.

Si bien en este estudio no se evaluaron las rutas de señalización para IR-A e IR-B, Westermeier y cols., (2013) observaron que en diabetes gestacional existe un aumento en la actividad p42/44^{mapk} el cual se correlacionó con el aumento en la expresión de IR-A. De hecho, diabetes gestacional mediante la actividad p42/44^{mapk}, aumenta la fosforilación en serina 1177 de la eNOS (fosforilación activadora), y la formación de L-citrulina (indicador de síntesis de NO) (Vásquez y cols., 2004; Westermeier y cols., 2011). Por lo tanto es posible sugerir que las actividades de p42/44^{mapk} y de eNOS, están involucradas en los efectos biológicos de insulina. Además, los niveles de mRNA y la abundancia de proteína para hCAT-1, y el transporte de L-arginina estimulados por insulina son dependientes de óxido nítrico (González y cols., 2004).

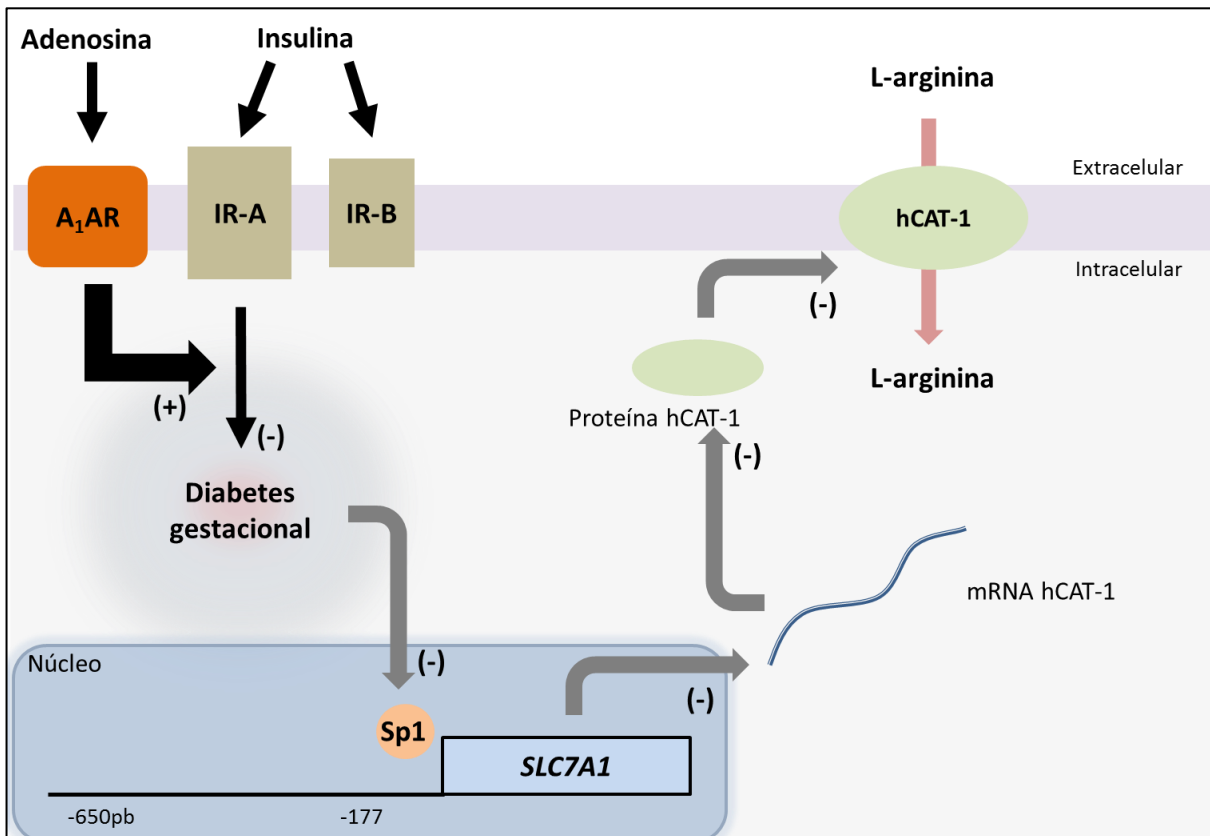


Figura 63. Modelo propuesto de la regulación del efecto de insulina vía IR-A por la activación del receptor de adenosina A₁ sobre la expresión y actividad de hCAT-1 en diabetes gestacional. Insulina, por la activación de la isoforma A del receptor de insulina (IR-A) revierte (-) el efecto de diabetes gestacional, efecto favorecido (+) por la actividad del receptor de adenosina A₁, disminuyendo la unión (flechas grises) del factor transcripcional Sp1, al promotor de *SLC7A1* (para hCAT-1), en una zona consenso que contiene 4 sitios para Sp1 (entre -177 y +1 pb desde el inicio de la transcripción), disminuyendo la actividad transcripcional del promotor *SLC7A1* en el fragmento entre -650 pb y el inicio de la transcripción. Estos cambios disminuirían los niveles de mRNA, y la abundancia de proteína para hCAT-1, y la actividad de transporte de L-arginina.

7. Conclusiones generales

Las conclusiones derivadas de esta tesis se enumeran a continuación:

1. La expresión de IR-A e IR-B modulan diferencialmente el efecto de insulina en endotelio fetal humano de embarazos normales o con diabetes gestacional.
2. Células HUVEC expuestas a insulina provenientes de embarazos con diabetes gestacional requieren de IR-A para revertir el aumento de la actividad de transporte y la expresión de hCAT-1, mientras que células provenientes de embarazos normales incubadas con esta hormona requieren de ambas isoformas para aumentar el transporte y la expresión de hCAT-1.
3. El efecto de insulina sobre el endotelio fetal humano con diabetes gestacional requiere de la actividad de receptores de adenosina tipo A_1 , mientras que el endotelio proveniente de embarazos normales requiere de la actividad de receptores de adenosina A_{2A} .

8. Proyecciones

Potenciales proyecciones derivadas de los hallazgos de esta tesis:

1. *Cross-talk* entre receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, e IR-A e IR-B en diabetes gestacional.

Dado que la presente tesis no se enfocó en los mecanismos de señalización entre los receptores de adenosina y de las isoformas del receptor de insulina, es de gran importancia determinar que moléculas de señalización están involucradas en esta regulación del efecto de insulina (Guzmán-Gutiérrez y cols., 2013). Existen diversas moléculas candidatas: para los receptores de adenosina, los niveles de AMP cíclico (AMPC), proteína quinasa A y la regulación del calcio intracelular (Fredholm y cols., 2001; 2011); y para las isoformas del receptor de insulina, sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1, IRS-2), quinasa de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3 (PI3K), proteína quinasa B (PKB), o quinasas activadas por mitógeno p42/44 (p42/44^{mapk}). Sin embargo, la eNOS es un posible candidato, puesto que posee numerosos sitios de regulación, y el NO regula la expresión hCAT-1 (González y cols., 2004).

2. Papel de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} en la sensibilidad a insulina en diabetes gestacional.

Como se comentó en la discusión, tanto el feto como la madre cursan con insulinoresistencia. En este contexto el uso de agonistas o antagonistas de receptores de adenosina son de potencial uso (Wojcik y cols., 2010; Chen y cols., 2013). De hecho, se ha propuesto el uso de agonistas de receptores de adenosina A₁, para mejorar la secreción de insulina en humanos (Burnstock & Novak, 2013). Sin embargo, es posible que la activación específica de receptores de adenosina A₁, mejoren la sensibilidad a insulina en otros tejidos, en donde exista resistencia a la insulina tejido específico (músculo esquelético, hígado, adipocitos, endotelio), de tal manera, de convertirse en una potencial objetivo terapéutico.

9. Referencias

- Albritton LM, Bowcock AM, Eddy RL, Morton CC, Tseng L, Farrer LA, Cavalli-Sforza LL, Shows TB, Cunningham JM. The human cationic amino acid transporter (ATRC1): physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics* 1992;12:430-4.
- Aljada A, Ghanim H, Saadeh R, Dandona P. Insulin inhibits NFkappaB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:450-3.
- Arancibia-Garavilla Y, Toledo F, Casanello P, Sobrevia L. Nitric oxide synthesis requires activity of the cationic and neutral amino acid transport system y+L in human umbilical vein endothelium. *Exp Physiol* 2003;88:699-710.
- Archer RG, Pitelka V, Hammond JR. Nucleoside transporter subtype expression and function in rat skeletal muscle microvascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2004;143:202-14.
- Ardiansyah, Hitoshi Shirakawa¹, Yumi Sugita¹, Takuya Koseki² and Michio Komai. Anti-metabolic syndrome effects of adenosine ingestion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr* 2010;104:48-55.
- Aulak KS, Liu J, Wu J, Hyatt SL, Puppi M, Henning SJ, Hatzoglou M. Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene. *J Biol Chem* 1996;271:29799-806.
- Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M. Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J Biol Chem* 1999;274:30424-32.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004;447:735-743.
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
- Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G, Mussoni L, Sironi L, Hamsten A, Tremoli E. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes* 2001;50:1522-30.
- Bar-Yehuda S, Stemmer SM, Madi L, Castel D, Ochaion A, Cohen S, Barer F, Zabutti A, Perez-Liz G, Del Valle L, Fishman P. The A3 adenosine receptor agonist CF102

- induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF-kappaB signal transduction pathways. *Int J Oncol* 2008;33:287-95.
- Becker BF, Kupatt C, Massoudy P, Zahler S. Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. *Z Kardiol* 2000;89: 88-91.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocr Rev* 2009;30:586-623.
- Belfiore A, Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:R125-47.
- Bergandi L, Silvagno F, Russo I, Riganti C, Anfossi G, Aldieri E, Ghigo D, Trovati M, Bosia A. Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2215-21.
- Bergholm R, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Tamminen M, Teramo K, Rissanen A, Yki-Järvinen H. Lowering of LDL cholesterol rather than moderate weight loss improves endothelium-dependent vasodilatation in obese women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1667-72.
- Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* 1983;42:3136-42.
- Barrett HL, Morris J, McElduff A. Watchful waiting: a management protocol for maternal glycaemia in the peripartum period. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009; 49:162-7.
- Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006; 27:327-32.
- Brown MA, North L, Hargood J. Uteroplacental Doppler ultrasound in routine antenatal care. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1990; 30:303-7.
- Burgdorf C, Richardt D, Kurz T, Seyfarth M, Jain D, Katus HA, Richardt G. Adenosine inhibits norepinephrine release in the postischemic rat heart: the mechanism of neuronal stunning. *Cardiovasc Res* 2001;49:713-20.
- Burgdorf C, Schütte F, Kurz T, Dendorfer A, Richardt G. Adenylyl cyclase-dependent inhibition of myocardial norepinephrine release by presynaptic adenosine A1-receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:1-3.
- Burnstock G. Vessel tone and remodeling. *Nat Med* 2006;12:16-17.

- Burnstock G, Fredholm BB, North RA, Verkhatsky A. The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol* 2010;199:93-147.
- Casanello P, Sobrevia L. Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems y⁺/hCAT-1 and y⁺/hCAT-2B and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 2002; 91:127-34.
- Casanello P, Escudero C, Sobrevia L. Equilibrative nucleoside (ENTs) and cationic amino acid (CATs) transporters: implications in foetal endothelial dysfunction in human pregnancy diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5:69-84.
- Casanello P, Krause B, Torres E, Gallardo V, González M, Prieto C, Escudero C, Farías M, Sobrevia L. Reduced l-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. *Placenta* 2009; 30:625-33.
- Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Wendum D, Clapéron A, Chrétien Y, Rey C, Scatton O, Soubrane O, Conti F, Praz F, Housset C, Rosmorduc O, Desbois-Mouthon C. Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors. *Cancer Res* 2013; 73:3974-86.
- Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickman MG, Odom-Ford R, Olefsky JM, Yen SS. Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1421-5.
- Ciccone MM, Scicchitano P, Salerno C, Gesualdo M, Fornarelli F, Zito A, Filippucci L, Riccardi R, Cortese F, Pini F, Angrisani L, Di Mauro A, Schettini F, Laforgia N. Aorta structural alterations in term neonates: the role of birth and maternal characteristics. *Biomed Res Int* 2013; 2013:459168.
- Cifuentes F, Palacios J, Vega JL, Casanello P, Sobrevia L. Vasoconstriction induced by serotonin is reduced by adenosine in human umbilical vein from gestational diabetes. *Placenta* 2010; 31:A35.
- Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol* 2006; 213:67-77.
- Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C675-82.

- Colomiere M, Permezel M, Riley C, Desoye G, Lappas M. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:567-578.
- Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3257-65.
- Derave W, Hespel P. Role of adenosine in regulating glucose uptake during contractions and hypoxia in rat skeletal muscle. *J Physiol* 1999; 515:255-63.
- Desoye G, and Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 2007;30:S120-S126.
- Desoye G, Hartmann M, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, Kohnen G, Kaufmann P. Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern. *Histochemistry* 1994; 101:277-85.
- Devés R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998;78:487-545.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130:963-74.
- Dhalla AK, Santikul M, Chisholm JW, Belardinelli L, Reaven GM. Comparison of the antilipolytic effects of an A1 adenosine receptor partial agonist in normal and diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11:95-101.
- Dye JF, Vause S, Johnston T, Clark P, Firth JA, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18:125-7.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 1985; 40:747-758.
- Edmunds NJ, Marshall JM. The roles of nitric oxide in dilating proximal and terminal arterioles of skeletal muscle during systemic hypoxia. *J Vasc Res* 2003; 40:68-76.
- Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 2009;111:904-915.

- Elzein E, Zablocki J. A1 adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17:1901-10.
- Escudero C, Bertoglia P, Hernandez M, Celis C, González M, Aguayo C, Acurio J. Impaired A_{2A} adenosine receptor/nitric oxide/VEGF signaling pathway in fetal endothelium during late- and early-onset preeclampsia. *Purinergic Signal* 2013; 9:215-26.
- Escudero C. & Sobrevia L. A hypothesis for preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium. *Placenta* 2008; 29:469-483.
- Escudero C, Puebla C, Westermeier F, Sobrevia L. Potential cell signalling mechanisms involved in differential placental angiogenesis in mild and severe pre-eclampsia. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; 7:475-85.
- Espinal J, Dohm GL, Newsholme EA. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised and exercise-trained rats. *Biochem J* 1983; 212:453-8.
- Espinoza J, Espinoza AF, Power GG. High fetal plasma adenosine concentration: a role for the fetus in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205:485.e24-7.
- Farías M, San Martin R, Puebla C, Pearson JD, Casado JF, Pastor-Anglada M, Casanello P, Sobrevia L. Nitric oxide reduces adenosine transporter ENT1 gene (SLC29A1) promoter activity in human fetal endothelium from gestational diabetes. *J Cell Physiol* 2006;208:451-460.
- Farías M, Puebla C, Westermeier F, Jo MJ, Pastor-Anglada M, Casanello P, Sobrevia L. Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP-C/EBPalpha in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes. *Cardiovasc Res* 2010; 86:45-54.
- Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, Biaggioni I. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A_{2B} receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* 2002;90:531-8.
- Fernandez P, Jara C, Aguilera V, Caviedes L, Diaz F, Radojkovic C, Veas C, Lamperti L, Escudero C, Aguayo C. Adenosine A_{2A} and A₃ receptors are involved in the human endothelial progenitor cells migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 59:397-404.

- Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, Snider MD, Hatzoglou M. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J Biol Chem* 2003; 278:50000-9.
- Figueroa R, Martinez E, Fayngersh RP, Tejani N, Mohazzab-H KM, Wolin MS. Alterations in relaxation to lactate and H₂O₂ in human placental vessels from gestational diabetic pregnancies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H706-13.
- Figler RA, Wang G, Srinivasan S, Jung DY, Zhang Z, Pankow JS, Ravid K, Fredholm B, Hedrick CC, Rich SS, Kim JK, LaNoue KF, Linden J. Links between insulin resistance, adenosine A_{2B} receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes* 2011; 60:669-79.
- Fishman P, Bar-Yehuda S, Madi L, Rath-Wolfson L, Ochaion A, Cohen S, Baharav E. The PI3K-NF-kappaB signal transduction pathway is involved in mediating the anti-inflammatory effect of IB-MECA in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R33.
- Flores C, Rojas S, Aguayo C, Parodi J, Mann G, Pearson JD, Casanello P, Sobrevia L. Rapid stimulation of L-arginine transport by D-glucose involves p42/44(mapk) and nitric oxide in human umbilical vein endothelium. *Circ Res* 2003; 92:64-72.
- Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278-3288.
- Fredholm BB, Lindström K, Dionisotti S, Ongini E. [3H]SCH 58261, a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist, is a useful ligand in autoradiographic studies. *J Neurochem* 1998; 70:1210-6.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53, 527-552.
- Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 2007;14:1315-23.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev* 2011; 63:1-34.
- Genua M, Pandini G, Cassarino MF, Messina RL, Frasca F. c-Abl and insulin receptor signalling. *Vitam Horm* 2009;80:77-105.

- Godfrey KM, Robinson S, Hales CN, Barker DJ, Osmond C, Taylor KP. Nutrition in pregnancy and the concentrations of proinsulin, 32-33 split proinsulin, insulin, and C-peptide in cord plasma. *Diabet Med*. 1996; 13:868-73.
- González M, Flores C, Pearson JD, Casanello P, Sobrevia L. Cell signalling-mediating insulin increase of mRNA expression for cationic amino acid transporters-1 and -2 and membrane hyperpolarization in human umbilical vein endothelial cells. *Pflugers Arch* 2004;448:383-394.
- González M, Gallardo V, Rodríguez N, Salomón C, Westermeier F, Guzmán-Gutiérrez E, Abarzúa F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Insulin-stimulated L-arginine transport requires *SLC7A1* gene expression and is associated with human umbilical vein relaxation. *J Cell Physiol* 2011 doi: 10.1002/jcp.22635 (a).
- González M, Muñoz E, Puebla C, Guzmán-Gutiérrez E, Cifuentes F, Nien JK, Abarzúa F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Maternal and fetal metabolic dysfunction in pregnancy diseases associated with vascular oxidative and nitrative stress. *E-Book Bentham Edi B Matata* 2011. (b).
- Green A. Adenosine receptor down-regulation and insulin resistance following prolonged incubation of adipocytes with an A1 adenosine receptor agonist. *J Biol Chem* 1987; 262:15702-7.
- Greene MF, Solomon CG. Gestational diabetes mellitus -- time to treat. *N Engl J Med* 2005; 352:2544-6.
- Grillo MA, Lanza A, Colombatto S. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids* 2008;34:517-23.
- Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1993; 290:297-308.
- Guzmán-Gutiérrez E, Sandoval C, Nova E, Castillo JL, Vera JC, Lamperti L, Krause B, Salomón C, Sepúlveda C, Aguayo C, Sobrevia L. Differential expression of functional nucleoside transporters in non-differentiated and differentiated human endothelial progenitor cells. *Placenta* 2010; 31:928-36.
- Guzmán-Gutiérrez E, Abarzúa F, Belmar C, Nien JK, Arroyo P, Salomón C, Westermeier F, Puebla C, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Functional link between adenosine and insulin: a hypothesis for the fetoplacental vascular endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol* 2011; 9:750-62.
- Guzmán-Gutiérrez E, Westermeier F, Salomón C, González M, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L. Insulin-increased L-arginine transport requires A(2A) adenosine

receptors activation in human umbilical vein endothelium. *PLoS One* 2012; 7:e41705.

Guzmán-Gutiérrez E, Arroyo P, Salsoso R, Fuenzalida B, Sáez T, Leiva A, Pardo F, Sobrevia L. Role of Insulin and Adenosine in the Human Placenta Microvascular and Macrovascular Endothelial Cell Dysfunction in Gestational Diabetes Mellitus. *Microcirculation* 2013. doi: 10.1111/micc.12077.

HAPO Study Cooperative Research Group, Nesbitt GS, Smye M, Sheridan B, Lappin TR, Trimble ER. Integration of local and central laboratory functions in a worldwide multicentre study: Experience from the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Clin Trials* 2006; 3:397-407.

HAPO Study Cooperative Research Group, Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358:1991-2002.

Hatzoglou M, Fernandez J, Yaman I, Closs E. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annu Rev Nutr* 2004;24:377-99.

Hammermann R, Brunn G, Racké K. Analysis of the genomic organization of the human cationic amino acid transporters CAT-1, CAT-2 and CAT-4. *Amino Acids* 2001;21:211-9.

Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Holloszy JO. Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes* 1998; 47:1671-5.

Herrera E, Ortega-Senovilla H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy - Are these the cause of the problem? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;24(4):515-25. doi: 10.1016/j.beem.2010.05.006.

Hidden U, Lang I, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, Lang U, Desoye G. Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:460-466.

Hidden U, Lassance L, Tabrizi NG, Miedl H, Tam-Amersdorfer C, Cetin I, Lang U, Desoye G. Fetal insulin and IGF-II contribute to gestational diabetes mellitus (GDM)-associated up-regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in the human fetoplacental endothelium. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3613-21.

Hidden U, Maier A, Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Wadsack C, Lang I, Dohr G, Desoye G. Insulin control of placental gene expression shifts from mother to foetus over the course of pregnancy. *Diabetologia* 2006; 49:123-31.

- Horovitz-Fried M, Brutman-Barazani T, Kesten D, Sampson SR. Insulin increases nuclear protein kinase Cdelta in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2008; 149:1718-27.
- Huang CC, Chiribau CB, Majumder M, Chiang CM, Wek RC, Kelm RJ Jr, Khalili K, Snider MD, Hatzoglou M. A bifunctional intronic element regulates the expression of the arginine/lysine transporter Cat-1 via mechanisms involving the purine-rich element binding protein A (Pur alpha). *J Biol Chem* 2009; 284:32312-20.
- Huang CJ, Tsai PS, Yang CH, Su TH, Stevens BR, Skimming JW, Pan WH. Pulmonary transcription of CAT-2 and CAT-2B but not CAT-1 and CAT-2A were upregulated in hemorrhagic shock rats. *Resuscitation* 2004; 63:203-12.
- Huidobro A, Fulford A, Carrasco E. Incidence of gestational diabetes and relationship to obesity in Chilean pregnant women. *Rev Med Chil* 2004; 132:931-8.
- Irie K, Tsukahara F, Fujii E, Uchida Y, Yoshioka T, He WR, Shitashige M, Murota S, Muraki T. Cationic amino acid transporter-2 mRNA induction by tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1997; 339:289-93.
- Jackson EK, Gillespie DG. Regulation of Cell Proliferation by the Guanosine-Adenosine Mechanism: Role of Adenosine Receptors. *Physiol Rep* 2013; 1:e00024.
- Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:247-64.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-56.
- Jo M, Krause B, Casanello P, Sobrevia L. Differential reactivity to insulin in human umbilical and chorionic vessels from normal and gestational diabetic pregnancies. *DOHaD* 2009 ; 1:S307.
- Johansson GS, Arnqvist HJ. Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:1124-1130.
- Joost HG, Steinfelder HJ. Modulation of insulin sensitivity by adenosine. Effects on glucose transport, lipid synthesis, and insulin receptors of the adipocyte. *Mol Pharmacol* 1982;22:614-618.
- Jones CJ, Hartmann M, Blaschitz A, Desoye G. Ultrastructural localization of insulin receptors in human placenta. *Am J Reprod Immunol* 1993; 30:136-45.

- Jung YD, Fan F, McConkey DJ, Jean ME, Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Ahmad SA, Parikh AA, Mukaida N, Ellis LM. Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappaB in interleukin-1beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells. *Cytokine* 2002; 18:206-13.
- Kalli KR, Falowo OI, Bale LK, Zschunke MA, Roche PC, Conover CA. Functional insulin receptors on human epithelial ovarian carcinoma cells: implications for IGF-II mitogenic signaling. *Endocrinology* 2002; 143:3259-67.
- Kassan M, Choi SK, Galán M, Bishop A, Umezawa K, Trebak M, Belmadani S, Matrougui K. Enhanced NF- κ B activity impairs vascular function through PARP-1-, SP-1-, and COX-2-dependent mechanisms in type 2 diabetes. *Diabetes* 2013; 62:2078-87.
- Katon J, Williams MA, Reiber G, Miller E. Antepartum A1C, maternal diabetes outcomes, and selected offspring outcomes: an epidemiological review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011; 25:265-76.
- Ke RH, Xiong J, Liu Y, Ye ZR. Adenosine A2a receptor induced gliosis via Akt/NF-kappaB pathway in vitro. *Neurosci Res* 2009; 65:280-5.
- Kellerer M, Sesti G, Seffer E, Obermaier-Kusser B, Pongratz DE, Mosthaf L, Häring HU. Altered pattern of insulin receptor isotypes in skeletal muscle membranes of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* 1993;36:628-632.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888-1904.
- Kim YC, Ji X, Melman N, Linden J, Jacobson KA. Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A(2B) adenosine receptors. *J Med Chem* 2000; 43:1165-72.
- Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;2:99-108.
- Klotz KN, Hessling J, Hegler J, Owman C, Kull B, Fredholm BB, Lohse MJ. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 357:1-9.

- Kolnes AJ, Ingvaldsen A, Bolling A, Stuenkel JT, Kreft M, Zorec R, Shepherd PR, Jensen J. Caffeine and theophylline block insulin-stimulated glucose uptake and PKB phosphorylation in rat skeletal muscles. *Acta Physiol (Oxf)* 2010; 200:65-74.
- Kosaki A, Pillay TS, Xu L, Webster NJ. The B isoform of the insulin receptor signals more efficiently than the A isoform in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1995;270:20816-23.
- Kristensen C, Wiberg FC, Schäffer L, Andersen AS. Expression and characterization of a 70-kDa fragment of the insulin receptor that binds insulin. Minimizing ligand binding domain of the insulin receptor. *J Biol Chem* 1998;273: 17780-17786.
- Kuzuya T, Matsuda A. Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency. *Diabetes Care* 1997; 20:219-20.
- Laine H, Nuutila P, Luotolahti M, Meyer C, Elomaa T, Koskinen P, Rönkämaa T, Knuuti J. Insulin-induced increment of coronary flow reserve is not abolished by dexamethasone in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1868-73.
- Laine H, Sundell J, Nuutila P, Raitakari OT, Luotolahti M, Rönkämaa T, Elomaa T, Koskinen P, Knuuti J. Insulin induced increase in coronary flow reserve is abolished by dexamethasone in young men with uncomplicated type 1 diabetes. *Heart* 2004; 90:270-6.
- Lam JK, Matsubara S, Mihara K, Zheng XL, Mooradian AD, Wong NC. Insulin induction of apolipoprotein AI, role of Sp1. *Biochemistry* 2003; 42:2680-90.
- Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol* 1999; 56:705-13.
- Lindsay RS, Westgate JA, Beattie J, Pattison NS, Gamble G, Mildenhall LF, Breier BH, Johnstone FD. Inverse changes in fetal insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 in association with higher birth weight in maternal diabetes. *Clin Endocrinol* 2007; 66:322-328.
- Liu SH, Shan LM, Wang H. Pharmacological characteristics of novel putative purinoceptors in vascular endothelium. *Cell Biol Int* 2002; 26:963-9.
- Liu B, Xu Y, Voss C, Qiu FH, Zhao MZ, Liu YD, Nie J, Wang ZL. Altered protein expression in gestational diabetes mellitus placentas provides insight into insulin resistance and coagulation/fibrinolysis pathways. *PLoS One* 2012; 7:e44701.

- Lopez AB, Wang C, Huang CC, Yaman I, Li Y, Chakravarty K, Johnson PF, Chiang CM, Snider MD, Wek RC, Hatzoglou M. A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem J* 2007; 402:163-73.
- Madi L, Cohen S, Ochayin A, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P. Overexpression of A3 adenosine receptor in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis: involvement of nuclear factor-kappaB in mediating receptor level. *J Rheumatol* 2007; 34:20-6.
- Maeda T, Koos BJ. Adenosine A1 and A2a receptors modulate insulinemia, glycemia, and lactatemia in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296:R693-701.
- Maguire MH, Szabó I, Valkó IE, Finley BE, Bennett TL. Simultaneous measurement of adenosine and hypoxanthine in human umbilical cord plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and on-line validation of peak purity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 707:33-41.
- Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003; 83:183-252.
- Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, Bischof P, Neidhart S, Grenningloh G, Castellucci M. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn* 2004; 231:839-48.
- Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, Hod M, Kitzmiller JL, Kjos SL, Oats JN, Pettitt DJ, Sacks DA, Zouzas C. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30:S251-60.
- Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 1998; 21:B161-7.
- Mohan S, Hamuro M, Koyoma K, Sorescu GP, Jo H, Natarajan M. High glucose induced NF-kappaB DNA-binding activity in HAEC is maintained under low shear stress but inhibited under high shear stress: role of nitric oxide. *Atherosclerosis* 2003; 171:225-34.
- Montecinos VP, Aguayo C, Flores C, Wyatt AW, Pearson JD, Mann GE, Sobrevia L. Regulation of adenosine transport by D-glucose in human fetal endothelial

- cells: involvement of nitric oxide, protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Physiol* 2000; 529:777-90.
- Moller DE, Yokota A, White MF, Pazianos AG, Flier JS. A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *J Biol Chem* 1989;265:14979-14985.
- Morello S, Sorrentino R, Porta A, Forte G, Popolo A, Petrella A, Pinto A. CI-IB-MECA enhances TRAIL-induced apoptosis via the modulation of NF-kappaB signalling pathway in thyroid cancer cells. *J Cell Physiol* 2009; 221:378-86.
- Morisset AS, St-Yves A, Veillette J, Weisnagel SJ, Tchernof A, Robitaille J. Prevention of gestational diabetes mellitus: a review of studies on weight management. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26:17-25.
- Mosthaf L, Vogt B, Häring HU, Ullrich A. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4728-4730.
- Mounier C, Posner BI. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84:713-24.
- Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 2007;28:463-91.
- Mundell S, Kelly E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808:1319-28.
- Muñoz G, San Martín R, Farías M, Cea L, Casanello P, Sobrevia L. Insulin restores glucose-inhibition of adenosine transport by increasing the expression and activity of the equilibrative nucleoside transporter 2 in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol* 2006; 209:826-35.
- Murao K, Wada Y, Nakamura T, Taylor AH, Mooradian AD, Wong NC. Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. *J Biol Chem* 1998 24; 273:18959-65.
- Murao K, Yu X, Imachi H, Cao WM, Chen K, Matsumoto K, Nishiuchi T, Wong NC, Ishida T. Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:E78-87.
- Nakao S, Ogtata Y, Shimizu E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2002; 238:11-8.

- Németh ZH, Bleich D, Csóka B, Pacher P, Mabley JG, Himer L, Vizi ES, Deitch EA, Szabó C, Cronstein BN, Haskó G. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *FASEB J* 2007; 21:2379-88.
- Niswender K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12:267-87.
- Nitert MD, Chisalita SI, Olsson K, Bornfeldt KE, Arnqvist HJ. IGF-I/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229:31-37.
- Norgren S, Li LS, Luthman H. Regulation of human insulin receptor RNA splicing in HepG2 cells: effects of glucocorticoid and low glucose concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:277-84.
- Nold JL, Georgieff MK. Infants of diabetic mothers. *Pediatr Clin North Am* 2004; 51:619-37.
- Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 1990; 70:761-845.
- Ongini E, Dionisotti S, Gessi S, Irenius E, Fredholm BB. Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359:7-10.
- Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 2002;277:39684-39695.
- Pandolfi A, Di Pietro N. High glucose, nitric oxide, and adenosine: a vicious circle in chronic hyperglycaemia? *Cardiovasc Res* 2010; 86:9-11.
- Pawelczyk T, Sakowicz-Burkiewicz M, Kocbuch K, Szutowicz A. Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine handling in rat T lymphocytes. *J Cell Biochem* 2005; 96:1296-310.
- Pérez-Pérez A, Maymó JL, Gambino YP, Guadix P, Dueñas JL, Varone CL, Sánchez-Margalet V. Activated translation signaling in placenta from pregnant women with gestational diabetes mellitus: possible role of leptin. *Horm Metab Res* 2013; 45:436-42.
- Phillips DI. Birth weight and the future development of diabetes. A review of the evidence. *Diabetes Care* 1998;21:150-155.

- Pietryga M, Brazert J, Wender-Ozegowska E, Dubiel M, Gudmundsson S. Placental Doppler velocimetry in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med* 2006; 34:108-10.
- Pimentel AM, Pereira NR, Costa CA, Mann GE, Cordeiro VS, de Moura RS, Brunini TM, Cláudio Mendes-Ribeiro A, Resende AC. L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertens Res* 2013; 36:783-8.
- Pinney SE, Simmons RA. Metabolic programming, epigenetics, and gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2012; 12:67-74.
- Puebla C, Farías M, González M, Vecchiola A, Aguayo C, Krause B, Pastor-Anglada M, Casanello P, Sobrevia L. High D-glucose reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving specific protein 1 in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol* 2008; 215:645-56.
- Ray CJ, Marshall JM. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. *J Physiol* 2006; 570:85-96.
- Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 2009; 373(9677):1789-97.
- Rotmann A, Strand D, Martiné U, Closs EI. Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. *J Biol Chem* 2004; 279:54185-92.
- Sala R, Rotoli BM, Colla E, Visigalli R, Parolari A, Bussolati O, Gazzola GC, Dall'Asta V. Two-way arginine transport in human endothelial cells: TNF-alpha stimulation is restricted to system y(+). *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C134-43.
- Salomón C, Westermeier F, Puebla C, Arroyo P, Guzmán-Gutiérrez E, Pardo F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Gestational diabetes reduces adenosine transport in human placental microvascular endothelium, an effect reversed by insulin. *PLoS One* 2012;7:e40578.
- Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10365-9.
- Samson SL, Wong NC. Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J Mol Endocrinol* 2002; 29:265-79.
- San Martin R, Sobrevia L. Gestational diabetes and the adenosine/L-arginine/nitric oxide (ALANO) pathway in human umbilical vein endothelium. *Placenta* 2006; 27:1-10.

- Savkur R, Philips V, Cooper H. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001;29:40-47.
- Schulte G, Fredholm BB. The G(s)-coupled adenosine A (2B) receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. *Exp Cell Res* 2003; 290:168-176.
- Sciacca L, Prisco M, Wu A, Belfiore A, Vigneri R, Baserga R. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology* 2003;144:2650-2658.
- Sciacca L, Cassarino MF, Genua M, Pandini G, Le Moli R, Squatrito S, Vigneri R. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. *Diabetologia* 2010; 53:1743-53.
- Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:114-118.
- Sen S, Talukdar I, Liu Y, Tam J, Reddy S, Webster NJ. Muscleblind-like 1 (Mbnl1) promotes insulin receptor exon 11 inclusion via binding to a downstream evolutionarily conserved intronic enhancer. *J Biol Chem* 2010; 285:25426-37.
- Sepulveda C, Puebla C, Casanello P, Sobrevia L. Human umbilical vein endothelial cells exhibit GLUTs-like transport activity modulated by insulin. *Placenta* 2010; 31:A78.
- Sesti G, Federici M, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17:363-373.
- Shepherd PR. Secrets of insulin and IGF-1 regulation of insulin secretion revealed. *Biochem J* 2004; 377:e1-2.
- Sheu ML, Chao KF, Sung YJ, Lin WW, Lin-Shiau SY, Liu SH. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. *Cell Signal* 2005; 17:975-84.
- Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Monopoli A, Ongini E, Baker SP, Belardinelli L. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation* 1998; 98:711-8.
- Simmons WW, Closs EI, Cunningham JM, Smith TW, Kelly RA. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes.

Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *J Biol Chem* 1996; 271:11694-702.

Steinberg HO, Baron AD. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 2002;45:623-34.

Sobrevia L, Abarzúa F, Nien JK, Salomón C, Westermeier F, Puebla C, Cifuentes F, Guzmán-Gutiérrez E, Leiva A, Casanello P. Review: Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes. *Placenta* 2011; 32:S159-64.

Sobrevia L, Cesare P, Yudilevich DL, Mann GE. Diabetes-induced activation of system y+ and nitric oxide synthase in human endothelial cells: association with membrane hyperpolarization. *J Physiol* 1995; 489:183-92.

Sobrevia L, Puebla C, Farías M, Casanello P. Role of equilibrative nucleoside transporters in fetal endothelial dysfunction in gestational diabetes. En: *Membrane Transporters and Receptors in Diseases*. Eds. L Sobrevia, P Casanello. Edit. *Research Signpost*, India. 2009. Págs.: 1-25.

Sobrevia L, González M. A Role for insulin on L-arginine transport in fetal endothelial dysfunction in hyperglycaemia. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; 7:467-474.

Sobrevia L, Mann GE. Dysfunction of the endothelial L-arginine-nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol* 1997; 82:1-30.

Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE. Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol* 1996; 490:775-81.

Sobrevia L, Yudilevich DL, Mann GE. Elevated D-glucose induces insulin insensitivity in human umbilical endothelial cells isolated from gestational diabetic pregnancies. *J Physiol* 1998; 506:219-30.

Solomon SS, Majumdar G, Martinez-Hernandez A, Raghov R. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. *Life Sci* 2008; 83:305-12.

Sonne MP, Højbjerg L, Alibegovic AC, Vaag A, Stallknecht B, Dela F. Diminished insulin-mediated forearm blood flow and muscle glucose uptake in young men with low birth weight. *J Vasc Res* 2010;47:139-47.

Speake PF, Glazier JD, Ayuk PT, Reade M, Sibley CP, D'Souza SW. L-Arginine transport across the basal plasma membrane of the syncytiotrophoblast of the human placenta from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4287-92.

- Srinivasan M, Herrero P, McGill JB, Bennik J, Heere B, Lesniak D, Davila-Roman VG, Gropler RJ, The Effects of Plasma Insulin and Glucose on Myocardial Blood Flow in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:42-48.
- Sundell J, Laine H, Nuutila P, Rönnemaa T, Luotolahti M, Raitakari O, Knuuti J. The effects of insulin and short-term hyperglycaemia on myocardial blood flow in young men with uncomplicated Type I diabetes. *Diabetologia* 2002; 45:775-82.
- Sundell J, Knuuti J. Insulin and myocardial blood flow. *Cardiovasc Res* 2003; 57:312-319.
- Susa JB, Neave C, Sehgal P, Singer DB, Zeller WP, Schwartz R. Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey. Effects of physiologic hyperinsulinemia on fetal growth and composition. *Diabetes* 1984; 33:656-60.
- Tchirikov M, Rybakowski C, Hüneke B, Schoder V, Schröder HJ. Umbilical vein blood volume flow rate and umbilical artery pulsatility as 'venous-arterial index' in the prediction of neonatal compromise. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 20:580-5.
- Thorsøe KS, Schlein M, Steensgaard DB, Brandt J, Schluckebier G, Naver H. Kinetic evidence for the sequential association of insulin binding sites 1 and 2 to the insulin receptor and the influence of receptor isoform. *Biochemistry* 2010; 49: 6234-46.
- Timmerman KL, Lee JL, Dreyer HC, Dhanani S, Glynn EL, Fry CS, Drummond MJ, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Volpi E. Insulin stimulates human skeletal muscle protein synthesis via an indirect mechanism involving endothelial-dependent vasodilation and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:3848-57.
- Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4:823-32.
- Töpfer M, Burbiel CE, Müller CE, Knittel J, Verspohl EJ. Modulation of insulin release by adenosine A1 receptor agonists and antagonists in INS-1 cells: the possible contribution of 86Rb⁺ efflux and 45Ca²⁺ uptake. *Cell Biochem Funct* 2008; 26:833-843.
- Tsai PS, Chen CC, Tsai PS, Yang LC, Huang WY, Huang CJ. Heme oxygenase 1, nuclear factor E2-related factor 2, and nuclear factor kappaB are involved in heme inhibition of type 2 cationic amino acid transporter expression and L-Arginine transport in stimulated macrophages. *Anesthesiology* 2006; 105:1201-10.

- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; 313:756-761.
- Vásquez G, Sanhueza F, Vásquez R, González M, San Martín R, Casanello P, Sobrevia L. Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium. *J Physiol* 2004; 560:111-22.
- Vásquez R, Farías M, Vega JL, Martín RS, Vecchiola A, Casanello P, Sobrevia L. D-glucose stimulation of L-arginine transport and nitric oxide synthesis results from activation of mitogen-activated protein kinases p42/44 and Smad2 requiring functional type II TGF-beta receptors in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol* 2007; 212:626-32.
- Vega JL, Puebla C, Vásquez R, Farías M, Alarcón J, Pastor-Anglada M, Krause B, Casanello P, Sobrevia L. TGF-beta1 inhibits expression and activity of hENT1 in a nitric oxide-dependent manner in human umbilical vein endothelium. *Cardiovasc Res* 2009;82:458-67.
- Vella V, Pandini G, Sciacca L, Mineo R, Vigneri R, Pezzino V, Belfiore A. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:245-54.
- Vergauwen L, Hespel P, Richter EA. Adenosine receptors mediate synergistic stimulation of glucose uptake and transport by insulin and by contractions in rat skeletal muscle. *J Clin Invest.* 1994;93:974-981.
- Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 2004;447:532-42.
- Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs EI, Sorkin A. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *J Biol Chem* 2011; 286:8697-706.
- Visigalli R, Barilli A, Bussolati O, Sala R, Gazzola GC, Parolari A, Tremoli E, Simon A, Closs EI, Dall'Asta V. Rapamycin stimulates arginine influx through CAT2 transporters in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:1479-87.
- von Mandach U, Lauth D, Huch R. Maternal and fetal nitric oxide production in normal and abnormal pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13:22-7.
- Wang Q, Huang R, Yu B, Cao F, Wang H, Zhang M, Wang X, Zhang B, Zhou H, Zhu Z. Higher fetal insulin resistance in Chinese pregnant women with gestational

- diabetes mellitus and correlation with maternal insulin resistance. *PLoS One* 2013; 8:e59845.
- Wang Y, Yang JN, Arner A, Boels PJ, Fredholm BB. Adenosine A(1) receptors and vascular reactivity. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;199:211-20.
- Wang CF, Zhang G, Zhao LJ, Qi WJ, Li XP, Wang JL, Wei LH. Overexpression of the insulin receptor isoform α promotes endometrial carcinoma cell growth. *PLoS One* 2013; 8:e69001.
- Wei B, Ta N, Li J, Zhang JF, Chen BL. Relationship between the inhibition of NF-kappaB and insulin resistance in uterus of rats with gestational diabetes mellitus. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2010; 26:235-7, 241.
- Webster JM, Heseltine L, Taylor R. In vitro effect of adenosine agonist GR79236 on the insulin sensitivity of glucose utilisation in rat soleus and human rectus abdominus muscle. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1316:109-13.
- Westgate JA, Lindsay RS, Beattie J, Pattison NS, Gamble G, Mildenhall LF, Breier BH, Johnstone FD. Hyperinsulinemia in cord blood in mothers with type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus in New Zealand. *Diabetes Care* 2006; 29:1345-1350.
- Westermeier F, Puebla C, Vega JL, Farías M, Escudero C, Casanello P, Sobrevia L. Equilibrative Nucleoside Transporters in Fetal Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus and Hyperglycaemia. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:435-449.
- Westermeier F, Salomón C, Arroyo P, Guzmán-Gutiérrez E, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L. Insulin reversal of gestational diabetes mellitus-reduced adenosine transport requires downregulation of insulin receptor A and p42/44mapk in human umbilical vein endothelium. *JCEM* 2013 (enviado).
- Westermeier F, Salomón C, González M, Puebla C, Guzmán-Gutiérrez E, Cifuentes F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Insulin restores gestational diabetes mellitus-reduced adenosine transport involving differential expression of insulin receptor isoforms in human umbilical vein endothelium. *Diabetes* 2011; 60:1677-87.
- Wierstra I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372:1-13.
- Wu G. Amino acid: metabolism, function, and nutrition. *Amino acid* 2009;37:1-17.
- Wyatt AW, Steinert JR, Wheeler-Jones CPD, Morgan AJ, Sugden D, Pearson JD, Sobrevia L, Mann GE. Early activation of the p42/p44 MAPK pathway

- mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium insensitive mechanism. *FASEB J* 2002; 16:1584-1594.
- Yan X, Zhu MJ, Xu W, Tong JF, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. Up-regulation of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappaB signaling is associated with enhanced adipogenesis and insulin resistance in fetal skeletal muscle of obese sheep at late gestation. *Endocrinology* 2010; 151:380-7.
- Yang GK, Fredholm BB, Kieffer TJ, Kwok YN. Improved blood glucose disposal and altered insulin secretion patterns in adenosine A(1) receptor knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303:E180-90.
- Yang Z, Venardos K, Jones E, Morris BJ, Chin-Dusting J, Kaye DM. Identification of a novel polymorphism in the 3'UTR of the L-arginine transporter gene *SLC7A1*: contribution to hypertension and endothelial dysfunction. *Circulation* 2007;115:1269-74.
- Yener S, Demir T, Akinci B, Bayraktar F, Kebapcilar L, Ozcan MA, Biberoglu S, Yesil S. Transforming growth factor-beta 1 levels in women with prior history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 76:193-8.
- Youngren J.F. Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci* 2007; 64:873-891.
- Zeng, G. and M. J. Quon. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;98:894-898.
- Zhang WZ, Venardos K, Finch S, Kaye DM. Detrimental effect of oxidized LDL on endothelial arginine metabolism and transportation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:920-8.
- Zhang WF, Hu DH, Xu CF, Lü GF, Dong ML, Dong ML, Zhao ZT, Zhu XX. [Inhibitory effect of insulin on nuclear factor-kappa B nuclear translocation of vascular endothelial cells induced by burn serum]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2010; 26:175-9.
- Zywert A, Szkudelska K, Szkudelski T. Effects of adenosine A(1) receptor antagonism on insulin secretion from rat pancreatic islets. *Physiol Res* 2012; 60:905-11.

Financiamiento

Esta tesis de grado fue desarrollada en el laboratorio de Fisiología Celular y Molecular (CMPL) de la División de Obstetricia y Ginecología, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El desarrollo de este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos de investigación y becas de estudio:

Proyectos de investigación

FONDECYT 1110977: Role of adenosine in insulin sensitivity of macro and microvascular placental endothelium from gestational diabetes mellitus via insulin receptor subtypes A and B.

CONICYT Anillos ACT-73: Characterization of the pathophysiological mechanisms, and detection of common therapeutic target in placental dysfunction in pathologies of the human pregnancy.

AECID A1/036123/11 (Gobierno de España): Transporte endotelial de L-carnitina en la hipertensión arterial

Becas asignadas

2010-2014	CONICYT Beca para estudios de doctorados en Chile
2012-2013	CONICYT Beca de apoyo de tesis doctoral (AT-24120944)
2012	CONICYT Beca de pasantía doctoral en el extranjero
2012-2013	CONICYT Beca de asistencia a Eventos y Cursos cortos en Chile y el extranjero
2012	VRAID Apoyo a la participación de doctorandos en congresos internacionales
2011	CONICYT Beca de asistencia a Eventos y cursos cortos en Chile

Publicaciones

- Westermeier F, Salomón C, Arroyo P, **Guzmán-Gutiérrez E**, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L. Insulin reversal of GDM-reduced adenosine transport requires downregulation of insulin receptor A and p42/44mapk in human umbilical vein endothelium. *JCEM* **2013** (Enviado).
- Pardo F, Arroyo P, Salomón C, Westermeier F, Salsoso R, Sáez T, **Guzmán-Gutiérrez E**, Leiva A, Sobrevia L. Role of Equilibrative Adenosine Transporters and Adenosine Receptors as Modulators of the Human Placental Endothelium in Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta* **2013** (en prensa)
- Leiva A, Diez de Medina C, Sáez T, San Martín S, Abarzúa F, Farías M, **Guzmán-Gutiérrez E**, Pardo F, Sobrevia L. Maternal hypercholesterolemia in pregnancy associates with placenta endothelial dysfunction: role of eNOS and arginase II. *ATVB* **2013** doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301987
- Guzmán-Gutiérrez E**, Arroyo P, Salsoso R, Fuenzalida B, Sáez T, Leiva A, Pardo F, Sobrevia L. Role of Insulin and Adenosine in the Human Placenta Microvascular and Macrovascular Endothelial Cell Dysfunction in Gestational Diabetes Mellitus. *Microcirculation* **2013**. doi: 10.1111/micc.12077.
- Aravena C, Beltrán AR, Cornejo M, Torres V, Díaz ES, **Guzmán-Gutiérrez E**, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L, Ramírez MA. Potential Role of Sodium-Proton Exchangers in the Low Concentration Arsenic Trioxide-Increased Intracellular pH and Cell Proliferation. *PLoS One* **2012**; 7:e51451.
- Guzmán-Gutiérrez E**, Westermeier F, Salomón C, González M, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L. Insulin-Increased L-Arginine Transport Requires A(2A) Adenosine Receptors Activation in Human Umbilical Vein Endothelium. *PLoS One* **2012**; 7:e41705.
- Salomón C, Westermeier F, Puebla C, Arroyo P, **Guzmán-Gutiérrez E**, Pardo F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Gestational diabetes reduces adenosine transport in human placental microvascular endothelium, an effect reversed by insulin. *PLoS One* **2012**; 7:e40578.
- Guzmán-Gutiérrez E**, Abarzúa F, Belmar C, Nien JK, Ramírez MA, Arroyo P, Salomón C, Westermeier F, Puebla C, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Functional link between adenosine and insulin: a hypothesis for fetoplacental vascular endothelial dysfunction in gestational diabetes. *Curr Vasc Pharmacol* **2011**; 9:750-62.

Westermeier F, Salomón C, González M, Puebla C, **Guzmán-Gutiérrez E**, Cifuentes F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Insulin restores restational diabetes mellitus-reduced adenosine transport involving differential expression of insulin receptor isoforms in human umbilical vein endothelium. *Diabetes* **2011**; 60:1677-87.

González M, Gallardo V, Rodríguez N, Salomón C, Westermeier F, **Guzmán-Gutiérrez E**, Leiva A, Abarzúa F, Casanello P, Sobrevia L. Insulin-stimulated L-arginine transport requires *SLC7A1* gene expression and is associated with human umbilical vein relaxation. *J Cell Physiol* **2011**; 226:2916-24.

Sobrevia L, Abarzúa F, Nien JK, Salomón C, Westermeier F, Puebla C, Cifuentes F, **Guzmán-Gutiérrez E**, Leiva A, Casanello P. Review: Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes. *Placenta* **2011**; 32:S159-S164.

Capítulos de Libro

Sobrevia L, Sáez T, Fuenzalida B, Salsoso R, Vázquez MC, Arroyo P, **Guzmán-Gutiérrez E**, Pardo F, Leiva A. Transporte transplacentario de calcio en Salud y Enfermedad. DANONE 2013 (En prensa).

Leiva L, Diez de Medina C, **Guzmán-Gutiérrez E**, Pardo F, Sobrevia L. Gestational Diabetes - Causes, Diagnosis and Treatment. Ed. Luis Sobrevia. Maternal Hypercholesterolemia in Gestational Diabetes and the Association with Placental Endothelial Dysfunction. Rijeka, Croatia. In Tech 2013. Chapter 6, pg 103-133.

Guzmán-Gutiérrez E, Arroyo P, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L. Gestational Diabetes - Causes, Diagnosis and Treatment. Ed. Luis Sobrevia. The Adenosine–Insulin Signaling Axis in the Fetoplacental Endothelial Dysfunction in Gestational Diabetes. Rijeka, Croatia. In Tech 2013. Chapter 4, pg 49-77.

Sobrevia L, **Guzman-Gutierrez E**, Westermeier F, Salomon C, Arroyo P, Palacios E, Bugueño K, Santos M, Diez de Molina C, González M, Escudero C, Mate A, Vazquez C, Pardo F, Leiva A. Recent research developments in physiology. Eds. Shankar Pandalai. Fetoplacental vascular pathophysiology in preeclampsia. Kerala, India. Research signpost 2012. Chapter 7, pg 105-158.

González M, Muñoz E, Puebla C, **Guzmán-Gutiérrez E**, Cifuentes F, Nien JK, Abarzúa F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. The molecular basis for origin of fetal congenital abnormalities and maternal health: An Overview of association with oxidative stress. Eds. BM Matata, M Elahi. Maternal and fetal metabolic dysfunction in pregnancy diseases associated with vascular oxidative and nitrative stress. Bentham 2011. USA. Chapter 8, pg 98-115.

Estadías de investigación

2011 Departamento de Fisiología y Zoología
Universidad de Sevilla, España

2012 Departamento de Fisiología y Zoología
Universidad de Sevilla, España

Anexos**CONSENTIMIENTO INFORMADO****Embarazadas sin patología asociada**

Título de las investigación: “La regulación del transporte de L-arginina vía hCAT-1 por insulina involucra activación diferencial de los subtipos A y B de receptores de insulina y receptores de adenosina en células endoteliales de vena umbilical humana de diabetes gestacional”

Investigador responsable: Enrique Guzmán-Gutiérrez
Dr. Luis Sobrevia L. (Tutor tesis doctoral)

Departamento: Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar, o no participar, en una investigación biomédica.

Objetivo de la investigación: Se estudiará el efecto de insulina y adenosina sobre la función del endotelio de la vena umbilical de embarazos con diagnóstico de diabetes gestacional. Por tener usted un embarazo normal, la invitación es a participar como parte del grupo de embarazadas sin patología asociada.

Procedimientos de la investigación: Para lograr el objetivo de la investigación, se recolectará la placenta de pacientes mayores de 18 años de edad, diagnosticadas como normales, sin patología asociada, con feto único y edad gestacional ≥ 37 semanas, de acuerdo a los criterios utilizados en el Hospital Clínico de la Universidad Católica. Pacientes con diabetes gestacional, diabetes gestacional en tratamiento con insulina, que presenten resistencia a insulina o en tratamiento con hipoglicemiantes, pre-eclampsia, síndrome hipertensivo del embarazo, retardo del crecimiento intrauterino, corioamnionitis

clínica, colestasia intrahepática del embarazo, isoinmunización Rh o D, presencia de meconio en el líquido amniótico, diabetes pre-gestacional o alguna patología crónica serán excluidas de esta investigación. Las placentas obtenidas no serán almacenadas para futuros estudios, pues serán utilizadas exclusivamente para realizar cultivos de células endoteliales derivadas microcirculación de placenta. Tampoco se realizarán estudios genéticos.

Beneficios: Usted o familiares no se beneficiarán por participar en esta investigación.

Riesgos: La toma de muestra de este tejido no involucra ningún riesgo para usted o su hijo/hija, puesto que las muestras son obtenidas de la placenta, que es un tejido que luego del nacimiento de su hijo/a es expulsado fuera de su cuerpo y después del parto no tiene ninguna utilidad ni para usted ni para su hijo/a.

Costos: Su participación no tiene ningún costo económico para usted. Todos los costos de la investigación serán asumidos por los investigadores.

Compensaciones: Este estudio no contempla compensaciones para usted.

Confidencialidad de la información: La información obtenida se mantendrá en forma confidencial. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo sus datos personales (nombres, información de contacto, etc.) o familiares no serán en ningún caso divulgados.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es completamente voluntaria y se le consultará durante el control prenatal. Usted tiene el derecho a retirar su consentimiento, y por tanto retirarse de esta investigación, en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y la calidad de la atención médica que se merece, no se verá afectada. Si usted retira su consentimiento, las muestras biológicas (que en este estudio corresponde a la placenta) serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

Preguntas: Si tiene preguntas acerca de esta investigación puede contactar al Sr. Enrique Guzmán-Gutiérrez en el teléfono 02-3548120, o al Dr. Luis Sobrevia (tutor de este proyecto de tesis doctoral) al teléfono 02-3548118.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado el propósito de esta investigación biomédica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten a mí y a mi hijo/hija.

Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzada a hacerlo.

Se me entregará una copia firmada de este documento.

_____	_____	_____
Nombre participante	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Investigador	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Representante Institucional	Firma	Fecha

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Embarazadas con patología asociada

Título de las investigación: “La regulación del transporte de L-arginina vía hCAT-1 por insulina involucra activación diferencial de los subtipos A y B de receptores de insulina y receptores de adenosina en células endoteliales de vena umbilical humana de diabetes gestacional”

Investigador responsable: Enrique Guzmán-Gutiérrez

Dr. Luis Sobrevia L. (Tutor tesis doctoral)

Departamento: Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar, o no participar, en una investigación biomédica.

Objetivo de la investigación: Se estudiará el efecto de insulina y adenosina sobre la función del endotelio de la vena umbilical de embarazos con diagnóstico de diabetes gestacional. Por tener usted un embarazo diagnosticado con diabetes gestacional, la invitación es a participar como parte del grupo de embarazadas con patología asociada.

Procedimientos de la investigación: Para lograr el objetivo de la investigación, se recolectará la placenta de pacientes mayores de 18 años de edad, diagnosticadas con diabetes gestacional, con feto único y edad gestacional ≥ 37 semanas. Este diagnóstico será hecho durante el control prenatal, donde las embarazadas serán evaluadas por personal calificado mediante una prueba de sobrecarga oral a la glucosa (75 gramos en ayuno) a las 26-28 semanas. Las embarazadas con glicemia de ayuno < 90 mg/dL y > 140 mg/dL post carga (2 hrs) serán diagnosticadas con diabetes gestacional y manejadas clínicamente con un régimen de 200 gramos de hidratos de carbono al día, siendo este grupo candidatas para la obtención de muestras, de acuerdo a los criterios utilizados en el Hospital Clínico de la

Universidad Católica. Por tales criterios, pacientes con diabetes gestacional en tratamiento con insulina, que presenten resistencia a insulina, en tratamiento con hipoglicemiantes, diagnosticadas con pre-eclampsia, síndrome hipertensivo del embarazo, retardo del crecimiento intrauterino, corioamnionitis clínica, colestasia intrahepática del embarazo, isoimmunización Rh o D, presencia de meconio en el líquido amniótico, diabetes pre-gestacional o alguna patología crónica serán excluidas de esta investigación. Las placentas obtenidas no serán almacenadas para futuros estudios, pues serán utilizadas exclusivamente para realizar cultivos de células endoteliales derivadas de la vena umbilical. Tampoco se realizarán estudios genéticos.

Beneficios: Usted o familiares no se beneficiarán por participar en esta investigación.

Riesgos: La toma de muestra de este tejido no involucra ningún riesgo para usted o su hijo/hija, puesto que las muestras son obtenidas de la placenta, que es un tejido que luego del nacimiento de su hijo/a es expulsado fuera de su cuerpo y después del parto no tiene ninguna utilidad ni para usted ni para su hijo/a.

Costos: Su participación no tiene ningún costo económico para usted. Todos los costos de la investigación serán asumidos por los investigadores.

Compensaciones: Este estudio no contempla compensaciones para usted o su hijo/hija.

Confidencialidad de la información: La información obtenida se mantendrá en forma confidencial. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo sus datos personales (nombres, información de contacto, etc.) los datos de su hijo/hija o familiares no serán en ningún caso divulgados.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es completamente voluntaria y se le consultará durante el control prenatal. Usted tiene el derecho a retirar su consentimiento, y por tanto retirarse de esta investigación, en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted, su hijo/hija o familiar, no pierde ningún derecho que le asiste como paciente

de esta institución y la calidad de la atención médica que se merece, no se verá afectada. Si usted retira su consentimiento, las muestras biológicas (que en este estudio corresponde a la placenta) serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

Preguntas: Si tiene preguntas acerca de esta investigación puede contactar al Sr. Enrique Guzmán-Gutiérrez en el teléfono 02-3548120, o al Dr. Luis Sobrevia (tutor de este proyecto de tesis doctoral) al teléfono 02-3548118.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado el propósito de esta investigación biomédica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten a mí y a mi hijo/hija.

Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzada a hacerlo.

Se me entregará una copia firmada de este documento.

_____	_____	_____
Nombre participante	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Investigador	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Representante Institucional	Firma	Fecha