

Péptido C en una población hipercolesterolémica venezolana

C Peptide in a Venezuelan hypercholesterolemic population

LETICIA FIGUEIRA^{A,B}, YAIRA MATHISON^C, MARIELLA PASTORELLO^A,
MARÍA GABRIELA MATOS^A, ELSA CAMACHO^A, EDUARDO ROMERO^C, JESÚS HERNÁNDEZ^D,
MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO^A, ELODIE BILLET^A, YUBIZALIZ LÓPEZ^C, ANITA ISRAEL^{A,*}

Resumen

El péptido C es un producto de la proinsulina el cual juega un papel fisiológico en diferentes tipos de células y que ha demostrado tener propiedades pro y anti-inflamatorias. Sin embargo, el mecanismo que involucra a este péptido en condiciones de inflamación de bajo grado es complejo y aún no bien comprendido. Por ello, en el presente trabajo se cuantificaron los niveles plasmáticos del péptido C y de mediadores inflamatorios en un grupo de 207 individuos voluntarios venezolanos hipercolesterolémicos con sobrepeso. Los mismos fueron subdivididos en dos grupos: Grupo 1, control (colesterol_t<200 mg/dL, N=164) y Grupo 2, hipercolesterolémicos (colesterol_t>200 mg/dL, N=43). Se realizó la evaluación clínica de los pacientes y se determinaron los niveles plasmáticos de glucosa y perfil lipídico por métodos enzimáticos, previo ayuno nocturno. Se determinaron los niveles de PCR por método inmunoturbidimétrico, las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento mediante el análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex). Nuestros hallazgos muestran que los pacientes hipercolesterolémicos presentaron niveles significativamente mayores de péptido C, grelina y PCR. El colesterol se correlacionó positivamente y significativamente con IL-2, IL-8, IFN- γ , eotaxina, grelina, VEGF, MCP-1, TNF- α , FGFb, G-CSF, PCR y el péptido C. Por su parte, el péptido C se correlacionó positivamente y significativamente con la eotaxina, G-CSF, INF- γ e IP-10 y con los marcadores de diabetes: glucagón, insulina, leptina, PAI-1, resistina, grelina, GIP, GLP-1, visfatina, adiponectina y adiposina. Mientras que el péptido C se correlacionó significativamente de manera inversa con IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 y IL-13. Estos datos indican que, en los pacientes hipercolesterolémicos de la población venezolana evaluada, subyacen alteraciones en el péptido C, citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, quimiocinas y en los marcadores de diabetes.

Palabras clave: Péptido C, colesterol, inflamación, proteína C reactiva, biomarcadores, enfermedades cardiovasculares.

Abstract

Peptide C is a product of proinsulin that plays a physiological role in different types of cells and has pro and anti-inflammatory properties. However, the mechanism that involves this peptide in conditions of low-grade inflammation is complex and not yet well understood. Thus, in the present study we assessed plasma levels of C-peptide and inflammatory mediators in a group of 207 hypercholesterolemic and overweight venezuelan voluntary subjects. They were divided into two groups: Group 1, control: (cholesterol_t<200 mg/dL, N=164) and Group 2, hypercholesterolemic (cholesterol_t>200 mg/dL, N=43). After nocturnal fasting, clinical parameters were determined in venous blood samples: fasting plasma glucose, total cholesterol, HDL-c, triglycerides and CRP. The levels of cytokines, chemokines and growth factors were also assessed by microsphere multiplex analysis (Bio-Plex). Our findings demonstrated that hypercholesterolemic patients present significantly higher levels of C-peptide, ghrelin and CRP. Cholesterol correlated positively and significantly with IL-2, IL-8, IFN- γ , eotaxin, ghrelin, VEGF, MCP-1, TNF- α , FGFb, G-CSF, CRP and C peptide. C peptide correlated positively and significantly with eotaxin, G-CSF, INF- γ , IP-10 and diabetes markers as: glucagon, insulin, leptin, PAI-1, resistin, ghrelin, GIP, GLP-1, visfatin, adiponectin and adiposin. Meanwhile, C peptide correlated negatively and significantly with IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13. These data indicate that in the venezuelan population studied in the hypercholesterolemic patients underlie alterations in C-peptide, inflammatory cytokines, adhesion molecules, chemokines and diabetes markers.

Key words: C peptide, cholesterol, inflammation, C reactive protein, biomarkers, cardiovascular disease.

- A Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
B Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Carabobo, Venezuela.
C Unidad de Farmacología, Escuela José María Vargas, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
D Cátedra de Bioquímica, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.
* Correspondencia: astern88@gmail.com.

Introducción

El péptido C es una molécula de 31 residuos de aminoácidos que resulta del clivaje de la proinsulina en su porción media, entre el segmento de las cadenas A y B de insulina (Wahren y col., 2004). Tanto el péptido C como la insulina son almacenados dentro de los gránulos secretores de las células beta pancreáticas, y son liberados al torrente sanguíneo en cantidades equimolares en respuesta a la estimulación de glucosa (Bhatt y col., 2014; Ghorbani y Shafie-Nick, 2015). Su deficiencia, junto con la de la insulina, es la principal característica de la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), y de la fase tardía de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (ADA, 2017); por lo que la determinación del péptido C en la práctica clínica es un método útil y ampliamente empleado para monitorear la función de la célula beta pancreática, la discriminación entre la DMT1 y DMT2, la detección de la deficiencia absoluta de insulina y la identificación de pacientes con diabetes de inicio adulto (Jones y Hattersley, 2013).

Desde hace muchos años se ha considerado al péptido C como un péptido inactivo; sin embargo, numerosos estudios revelan que esta molécula juega un papel fisiológico en diferentes tipos de células (Zhong y col., 2004); de hecho, el pentapéptido C terminal del péptido C tiene actividad de estimular la adenosina trifosfatasa de Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPasa) (Ohtomo y col., 1998). Asimismo, estudios en modelos animales de DMT1 revelan que el péptido C posee efectos positivos en la fase temprana de la nefropatía, retinopatía y neuropatía (Sjoquist y col., 1998; Samnegard y col., 2005; Lim y col., 2014), teniendo también un impacto positivo sobre los riñones, retina y nervios en pacientes con

DMT1 y DMT2 (Shaw y col., 2015; Wahren y col., 2016; Qiao y col., 2017); de igual manera se ha descrito que altas dosis de péptido C fueron capaces de reducir la formación de trombos, incrementando el flujo sanguíneo microvascular en la piel de pacientes con DMT1, posiblemente mediante estimulación de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y la producción de óxido nítrico (NO) (Forst y col., 2000).

Asimismo, se ha demostrado que el péptido C tiene propiedades pro y antitrombóticas dependiendo de las condiciones fisiopatológicas del organismo; en este sentido se ha postulado que el péptido C es capaz de inhibir la adhesión plaquetaria al endotelio en presencia de hematíes, mediante la estimulación de la producción de adenosina trifosfato (ATP) en el hematíe, el cual induce la producción de NO en las plaquetas y endotelio (Karunarathne y col., 2009). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el péptido C tiene propiedades proinflamatorias, pues el depósito de este péptido en la capa íntima de vasos sanguíneos, promueve la infiltración de monocitos/ macrófagos y linfocitos CD4^+ , favoreciendo el proceso aterogénico (Marx y col., 2004; Walcher y col., 2004). Además, induce la proliferación y migración de células de músculo liso vascular, promoviendo el desarrollo de la aterosclerosis; sin embargo, bajo condiciones de hiperglicemia, la incubación de péptido C en células de músculo liso aórtico de ratas reduce la proliferación y migración de células de músculo liso vascular (Kobayashi y col., 2005); por lo que este péptido puede ser un marcador sérico de enfermedades cardiovasculares.

La inflamación y la hipercolesterolemia han sido reportados como dos de los factores de riesgo más importantes en

la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (Ferroni y col., 2003; Wang y col., 2017); en este sentido, se ha descrito que la hipercolesterolemia es un factor clave involucrado en la disfunción endotelial y en la etiopatogenia de las enfermedades cardiovasculares (Ferroni y col., 2003). De hecho, se ha demostrado que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (LDLox) inhiben la liberación de NO, inhiben la vasodilatación dependiente del endotelio y disminuyen la expresión de la sintasa de NO (eNOS) (Nevala y col., 2000; Seppo y col., 2000), además es un componente clave en la activación de células endoteliales y macrófagos, y está asociado con hipercoagulabilidad (Ferroni y col., 2003).

A pesar de que está establecido el papel de la inflamación y de la hipercolesterolemia en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares; no se tiene claro cuál es el papel que cumple el péptido C en condiciones de inflamación de bajo grado y todavía menos su relación con otros marcadores de inflamación. Es por ello que en el presente estudio se evaluó mediante el análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex), los niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios, y el péptido C en un grupo de adultos venezolanos hipercolesterolémicos con sobrepeso.

Materiales y métodos

SUJETOS

Se estudiaron a 207 sujetos de ambos géneros, con edades comprendidas entre 18 y 65 años, seleccionados entre los que asistieron de manera voluntaria a la consulta de Medicina Interna del Hospital Vargas de Caracas y a la consulta de la Unidad de Neuropeptidos de la Facultad de Farmacia, Universidad

Central de Venezuela (UCV) (Caracas, Venezuela) desde julio de 2012 hasta abril de 2015. Los mismos fueron subdivididos en dos grupos de acuerdo a sus cifras de colesterol total: **Grupo 1:** colesterol < 200 mg/dL (N=164) y **Grupo 2:** colesterol > 200 mg/dL (N=43). Se aplicó una encuesta a fin de conocer acerca de sus antecedentes médicos, personales, familiares y hábitos de vida. La selección buscó una distribución homogénea de individuos con condiciones socio-económicas similares. A los grupos en estudio, se les comunicó acerca de las características e importancia del estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Fueron excluidos del estudio aquellos sujetos con hábito tabáquico mayor que 20 paq/año, la presencia de proteinuria franca y/o diagnóstico previo de nefropatías, independientemente de su etiología, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, lupus eritematoso sistémico, mieloma múltiple y pacientes con hipertensión grado 2 o 3.

Los sujetos fueron sometidos a examen físico determinando talla, peso, índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura (CC) y presión arterial (PA). La PA fue determinada, en horas de la mañana al sujeto sentado y después de 10 minutos de reposo, mediante el uso de un esfigmomanómetro de mercurio. El valor de PA fue el promedio de dos determinaciones, realizadas con un intervalo de un minuto entre ellas.

Las condiciones pre-analíticas fueron las recomendadas mundialmente para este tipo de valoraciones: ayuno de 8-12 horas y sin dieta previa habitual, evitando ejercicios extenuantes, estrés, entre otros. La muestra de sangre se obtuvo mediante venopunción directa

en la región antecubital con agujas múltiples (Venojet®), utilizando tubos con EDTA. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y en el plasma se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva (PCR), perfil lipídico, glucosa, citocinas, quimiocinas y marcadores de diabetes.

Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas y cumplen con la Declaración de Helsinki para experimentación con seres humanos (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 1975 y revisada en 1983).

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Todos los métodos fueron procedimientos estándar utilizados en laboratorios de la Unidad de Neuropeptidos de la Facultad de Farmacia, UCV. Para la medición de los parámetros clínicos, se recogieron muestras de sangre venosa después de ayuno nocturno. La glucosa, el colesterol total, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDLc) y los triglicéridos, se determinaron por métodos enzimáticos Trinder (Stanbio), las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro y los resultados expresados en mg/dL. La determinación cuantitativa de la PCR se realizó por método inmunturbidimétrico (Alpco, EEUU).

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS, MOLÉCULAS DE ADHESIÓN, QUIMIOCINAS Y MARCADORES DE DIABETES

Todas las muestras de plasma se evaluaron por duplicado mediante el

análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex Pro Assays Cytokine, Chemokine, and Growth Factors, Life Science Grup, BIORAD). Brevemente, el sistema Bio-Plex® se basa en tres núcleos tecnológicos. El primero constituye una tecnología novedosa que emplea hasta 100 microesferas de poliestireno (5,6 µm) o magnéticas (8 µm), teñidas fluorescentemente codificadas con un código espectral (Tecnología xMAP), la cual permite la detección simultánea de 100 moléculas diferentes en uno sólo de los pozos de la microplaca de 96 pozos. El segundo es un citómetro de flujo con dos rayos láser asociados a un sistema óptico que permite cuantificar las diferentes moléculas unidas a la superficie de las microesferas. El tercero está constituido por un procesador de señal digital de alta velocidad que maneja los datos de fluorescencia con alta eficiencia. Esta técnica nos permitió estudiar en forma simultánea las concentraciones circulantes de péptido C, glucagón, insulina, leptina, PAI-1, resistina, grelina, visfatina, adiponectina, adiposina, GIP, GLP-1, el antagonista del receptor de interleucina 1 (IL1-ra), interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15 e IL-17, de las citocinas eotaxina, factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos (GM-CSF), el interferón gamma (INF-γ), quimioquina-10 motivo C-X-C (IP-10/CXCL10), proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa/beta (MIP-1a/b), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), ligando 5 de la quimiocina CC (CCL5/RANTES), factor de necrosis tumoral -α (TNF-α) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los datos fueron expresados como pg/mL.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad InStat. Los datos se presentan como las media ± error estándar de la media (E.E.M.). Se utilizó la prueba de U de Mann Whitney para comparar los valores de las variables de los grupos sujetos a estudio. Las correlaciones entre las variables fueron realizadas por la prueba de correlación de Spearman. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS SUJETOS

Las características clínicas de los grupos experimentales se resumen en la **tabla I**. La distribución en sexo de los sujetos fue de 114 mujeres (Grupo 1=86 y Grupo 2= 28) y 93 hombres (Grupo 1=78 y Grupo 2= 15). No se observaron diferencias significativas en la edad, peso, talla, IMC, circunferencia abdominal (CA), PA sistólicas (PAS), PA diastólica (PAD) y HDLc entre los dos grupos experimentales. Se observó un incremento significativo en los valores de la glicemia, triglicéridos, colesterol total y PCR en los pacientes del Grupo 2 al compararlos con el Grupo 1 ($p < 0,0001$).

El análisis de Spearman de las correlaciones entre el colesterol total con las características clínicas y los niveles de PCR en los sujetos se muestran en la **tabla II**, donde se evidencia que el colesterol total se correlacionó de manera positiva con la edad, glicemia, triglicéridos y PCR.

NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS, MOLÉCULAS DE ADHESIÓN, Y QUIMIOCINAS DETERMINADOS MEDIANTE EL USO DEL INMUNOENSAYO DE MICROESFERAS MULTIPLEX.

Tabla I

Características clínicas y bioquímicas de los pacientes sujetos a estudio

Parámetro	Colesterol <200 mg/dL	Colesterol >200 mg/dL
N=207 F/M	N= 164 86/78	N= 43 28/15
Edad (años)	37,41 ± 1,01	44,07 ± 0,94
Peso (Kg)	80,08 ± 1,63	79,54 ± 1,57
Talla (cm)	1,66 ± 0,01	1,63 ± 0,01
IMC (Kg/m ²)	28,80 ± 0,55	29,60 ± 0,51
CA (cm)	94,69 ± 1,30	96,14 ± 1,16
PAS (mmHg)	123,71 ± 1,24	126,48 ± 1,35
PAD (mmHg)	81,48 ± 0,9	83,67 ± 0,95
Glicemia (mg/dL)	85,89 ± 1,30	91,19 ± 0,75***
Triglicéridos (mg/dL)	108,04 ± 4,7	161,15 ± 8,63***
HDLc (mg/dL)	39,71 ± 0,82	41,01 ± 1,03
Colesterol _t (mg/dL)	144,5 ± 2,99	234,39 ± 3,07***
PCR (mg/L)	4,99 ± 0,33	7,46 ± 1,11**

*** $p < 0,0001$ comparado con colesterol <200mg/dL

** $p = 0,0067$ comparado con colesterol <200mg/dL

El método de la microesferas multiplex permitió detectar 27 biomarcadores: citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y quimiocinas y 11 marcadores de diabetes en los sujetos evaluados. Bajo nuestras condiciones experimentales,

Tabla II

Análisis de la correlación de Spearman entre colesterol total y las características clínicas y bioquímicas de todos los sujetos

	r	p
COL _t & Edad	0,1869	0,0074
COL _t & Glicemia	0,2619	0,0002
COL _t & Triglicéridos	0,2319	0,0009
COL _t & PCR	0,3859	0,0001

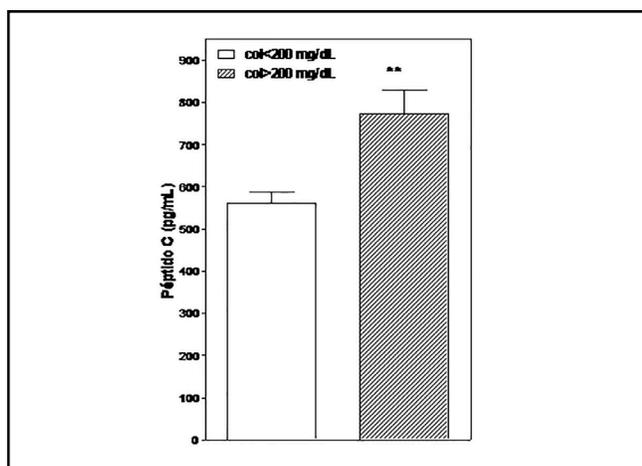


Figura 1. Niveles plasmáticos de péptido C en sujetos adultos subdivididos en dos grupos de acuerdo a los niveles de colesterol total: Grupo 1: colesterol <200 mg/dL (N=164) y Grupo 2: colesterol >200 mg/dL (N=43), **p<0,001 comparado con colesterol<200 mg/dL.

Los niveles plasmáticos de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales a excepción

Tabla III

Concentración de las citocinas plasmáticas (pg/mL) en los grupos sujetos a estudio

Parámetro	Colesterol <200 mg/dL	Colesterol >200 mg/dL
N=207	N= 164	N= 43
F/M	86/78	28/15
IL-2	33,41 ± 2,64	30,21 ± 3,08
IL-4	22,34 ± 2,50	22,57 ± 2,58
IL-6	29,13 ± 2,29	28,37 ± 2,69
IL-8	39,07 ± 3,27	35,58 ± 2,52
IL-17	42,20 ± 3,29	39,86 ± 3,61
Eotaxina	146,52 ± 10,66	166,56 ± 7,73
FGFb	45,08 ± 2,81	42,28 ± 3,14
G-CSF	44,29 ± 2,85	49,25 ± 2,62
IFN-γ	256,13 ± 32,93	266,38 ± 31,91
MCP-1	69,41 ± 5,43	65,04 ± 4,77
RANTES	16550,5 ± 3165	10796,6 ± 1310
TNF-α	39,78 ± 3,51	36,09 ± 2,68
VEGF	53,01 ± 5,41	44,86 ± 3,26
Grelina	621,45 ± 44	794,56 ± 38*

*p<0,0407 comparado con colesterol<200 mg/dL

Tabla IV

Análisis de la correlación de Spearman entre colesterol y niveles plasmáticos de citocinas

	r	p
COL _t & IL-2	0,2426	0,0772
COL _t & IL-8	0,2267	0,0011
COL _t & IFN-γ	0,2882	0,0001
COL _t & eotaxina	0,2743	0,0001
COL _t & grelina	0,3524	0,0001
COL _t & VEGF	0,1190	0,0942
COL _t & MCP-1	0,1177	0,0969
COL _t & TNF-α	0,1946	0,0054
COL _t & FGFb	0,1407	0,0450
COL _t & G-CSF	0,3459	0,0001
COL _t & Péptido C	0,4400	0,0001

de la grelina y péptido C cuyos niveles plasmáticos fueron significativamente mayores en los sujetos del Grupo 2 al compararlos con el Grupo 1 (p<0,01y p<0,047) (**Figura 1, Tabla III**).

El análisis de Spearman de las correlaciones entre el colesterol total y los niveles plasmáticos de grelina, citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y quimiocinas de todos los sujetos se muestra en la **tabla IV**, donde se indican los valores de "r" y la significancia estadística (p). Los resultados demuestran que el colesterol total se correlacionó positivamente y significativamente con la IL-2, IL-8, IFN-γ, eotaxina, grelina, VEGF, MCP-1, TNF-α, FGFb, G-CSF y el péptido C.

CORRELACIONES ENTRE EL PÉPTIDO C Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS, QUIMIOCINAS Y MARCADORES DE DIABETES

En las **tablas V, VI y VII** se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre el péptido C y los niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y marcadores de diabetes de todos los sujetos. Los resultados demuestran

Tabla V

Análisis de la correlación de Spearman entre el péptido C y los niveles plasmáticos de interleucinas

	r	p
Péptido C & IL-4	-0,2025	0,0121
Péptido C & IL-5	-0,2764	0,0012
Péptido C & IL-7	-0,1764	0,0338
Péptido C & IL-10	-0,3347	0,0001
Péptido C & IL-13	-0,2577	0,0013

que el péptido C se correlacionó significativamente de manera inversa con IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 y IL-13 (**Tabla V**), y positivamente y significativamente con eotaxina, G-CSF, INF- γ e IP-10 (**Tabla VI**) y con los marcadores de diabetes: glucagón, insulina, leptina, PAI-1, resistina, grelina, GIP, GLP-1, visfatina, adiponectina y adiposina (**Tabla VII**).

Tabla VI

Análisis de la correlación de Spearman entre el péptido C y los niveles plasmáticos de citocinas y moléculas de adhesión

	r	p
Péptido C & Eotaxina	0,2649	0,0010
Péptido C & G-CSF	0,1878	0,0201
Péptido C & IFN- γ	0,3867	0,0001
Péptido C & IP-10	0,3634	0,0001

Discusión

El péptido C es un péptido de corta vida media y tamaño, de 31 residuos de aminoácidos, identificado como un producto de la proinsulina. Datos disponibles establecen que el péptido C es una hormona activa con efectos fisiológicos importantes en diferentes tipos de células (Wahren y col., 2004; Zhong y col., 2004). De hecho, a pesar de que no se ha revelado su receptor, se ha descrito la presencia de interacciones

Tabla VII

Análisis de la correlación de Spearman entre el péptido C y los niveles plasmáticos de marcadores de diabetes

	r	p
Péptido C & Glucagon	0,5122	0,0001
Péptido C & Insulina	0,5807	0,0001
Péptido C & Leptina	0,3675	0,0001
Péptido C & PAI-1	0,2768	0,0005
Péptido C & Resistina	0,3278	0,0001
Péptido C & Grelina	0,3506	0,0001
Péptido C & GIP	0,2972	0,0002
Péptido C & GLP-1	0,4414	0,0001
Péptido C & Visfatina	0,4157	0,0001
Péptido C & Adiponectina	0,3479	0,0001
Péptido C & Adiposina	0,2039	0,0112

péptido C – membrana celular, y se conoce que este péptido activa diferentes vías de señalización en diversos tipos de células como las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2 quinasas), fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI-3 quinasa), Rho GTPasas, entre otras (Kitamura y col., 2001, 2002).

Los efectos del péptido C son controversiales; por un lado, se ha descrito acciones beneficiosas en complicaciones de la DMT1, pues es capaz de mejorar la hiperfiltración e hipertrofia glomerular y la proteinuria (Kamiya y col., 2006; Ekber y col., 2007; Nordquist y col., 2007), además de mejorar la deformabilidad de los eritrocitos en los pacientes DMT1 mediante el incremento de la actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa (Kunt y col., 1999; Starzyk y col., 1999). De igual manera, se ha descrito que la administración de péptido C ocasiona una disminución de la glicemia basal en ayunas, de la urea, creatinina, angiotensina II (ANGII), TNF- α y malonildialdehído, y un incremento de los niveles de insulina sanguínea en pacientes diabéticos con respecto a los no tratados, siendo dichos efectos

beneficiosos mediados en parte por el NO, sugiriendo que la deficiencia del péptido C podría contribuir a los errores metabólicos y renales ya que el tratamiento con el péptido corrige estos cambios (Elbassuoni y col., 2018). Asimismo, se ha demostrado que el péptido C acelera la angiogénesis mediante la estimulación de las ERK1/2, Akt y la producción de NO (Lim y col., 2015). Además, reduce la apoptosis inducida por alta glucosa en células endoteliales mediante la disminución de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cifarelli y col., 2011). Sin embargo, en pacientes con DMT2, el péptido C muestra efectos pro-inflamatorios y pro-aterogénicos (Marx y col., 2004; Vasic y Walcher, 2012).

Estudios recientes han descrito a esta molécula como un nuevo e importante factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares o para muertes generales en adultos no diabéticos (Min y col., 2013). En este sentido, algunos estudios sugieren que el péptido C puede depositarse en la pared de los vasos sanguíneos desde las fases iniciales de la aterosclerosis y promover el reclutamiento de monocitos y linfocitos (Marx y col., 2004; Walcher y col., 2004).

En el presente estudio se evidenció un aumento de los niveles plasmáticos de péptido C en los sujetos con hipercolesterolemia con respecto a los normocolesterolémicos; así como correlación positiva del colesterol con el péptido C, y de este último con marcadores de diabetes, obesidad e inflamación como la insulina, PCR, leptina, grelina, resistina, PAI-1, visfastina, adiponectina y adiposina. De hecho, la evidencia ha señalado que el péptido C es un marcador de resistencia a la insulina y obesidad, específicamente en pacientes con DMT2, pues sus niveles se han encontrado elevados en pacientes con

síndrome metabólico y diabetes (Chan y col., 2004; Vasic y Walcher, 2012), y se ha asociado de manera positiva con infarto al miocardio de manera independiente de los niveles de insulina en pacientes con diabetes y sin diabetes (Jin-Young y Kyoung-Bok, 2013; Li y col., 2014; Cabrera y col., 2015; Li y col., 2015); sugiriendo que los elevados niveles de péptido C debido a la resistencia a la insulina, contribuyen a la enfermedad vascular aterosclerótica en esos pacientes. Por lo tanto, el incremento de los niveles de péptido C observado en el presente estudio podría representar la consecuencia de la hipercolesterolemia que evidencian los pacientes, debido a los efectos pro-inflamatorios descritos a este péptido; o alternativamente podría constituir una respuesta compensatoria al aumento de los niveles plasmáticos de colesterol en los sujetos, debido a los efectos antiinflamatorios de esta molécula; por lo tanto, el péptido C podría constituir un marcador de riesgo cardiovascular. En este sentido, se ha postulado que el péptido C es mejor predictor de mortalidad general y de muertes relacionadas con enfermedades cardiovasculares que los niveles séricos de insulina en individuos no diabéticos; sin embargo, no se tiene claro cuál es el mecanismo de tal asociación (Min y Min, 2013). Así, la evidencia basada en estudios clínicos, epidemiológicos y experimentales han mostrado que la hiperinsulinemia está asociada con diferentes factores de riesgo cardiovascular, tales como la hipertensión, obesidad, elevados niveles de triglicéridos y bajos niveles de HDLc (Reaven, 2005), lo cual puede promover la aterogénesis a través de sus efectos sobre el metabolismo de los lípidos y la presión arterial, siendo la obesidad uno de los factores más importantes asociados a la hiperinsulinemia (Reaven, 2011); dado que los elevados niveles de insulina y péptido C coexisten, es posible que el

péptido C presente un mecanismo similar promoviendo la aterogénesis (Wahren y col., 2004).

En este sentido, se ha descrito que el péptido C está más fuertemente asociado con la distribución de la grasa corporal regional y total en sujetos no diabéticos que los niveles de insulina (Li y col., 2014). De igual manera, Abdullah y col. (2012) encontraron mayores valores de IMC y CC; y de niveles de marcadores como leptina, insulina basal, ácido úrico, índice HOMA, péptido C, PCR, colesterol asociado a LDL (LDLc), PAS, PAD, en mujeres con sobrepeso y obesidad con respecto a mujeres con normopeso; evidenciando además que el péptido C se correlacionó con la CC, leptina, ácido úrico y HDLc, lo cual sugiere la asociación entre el síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares en mujeres jóvenes, así como su posible papel en la predicción de las enfermedades cardiovasculares y del síndrome metabólico. De igual manera, Li y col. (2015), encontraron que el péptido C es un importante factor de riesgo cardiovascular, que se correlaciona de manera inversa con los niveles séricos de HDLc, de manera independiente de los valores de insulina, sugiriendo que el péptido C puede incrementar el riesgo de eventos cardiovasculares mediante la reducción de los niveles de HDLc. Por lo tanto, el péptido tiene valor predictivo para biomarcadores cardiovasculares como HDLc, CC y ácido úrico, enfatizando su papel como un posible marcador adicional para enfermedades cardiovasculares en sujetos obesos (Wahren y col., 2004).

De igual manera, Wang y col. (2019) encontraron mayores niveles de péptido C e insulina, colesterol total, triglicéridos y LDLc y menor HDLc en pacientes con resistencia a la insulina con respecto a los

controles normoglicémicos; sugiriendo que la dislipidemia prevalece en estados de resistencia a la insulina; sin embargo, no se conoce si la dislipidemia puede conducir a este estado o viceversa, desde que se piensa que elevados niveles de triglicéridos y bajos de HDLc son consecuencia de la resistencia a la insulina (Laws y Reaven, 1992); mientras que otros estudios indican que la resistencia a la insulina es causada por la dislipidemia (IEC, 2009).

Diversos estudios han apuntado a una interrelación entre los lípidos y la inflamación; de hecho, se ha descrito cómo depósitos muy tempranos de colesterol LDL mínimamente modificados son capaces de activar al inflamasoma intracelular NLRP3, el cual es crítico para la activación de las caspasas y la subsecuente producción y secreción de IL-1 β (Düwell y col., 2010; Rajamaki y col., 2010); indicando y describiendo la vía por la cual el colesterol puede inducir directamente la respuesta proinflamatoria, constituyendo una señal activadora de la inflamación. Asimismo, la continua liberación de citocinas por el endotelio y las células espumosas perpetúa el proceso inflamatorio. De hecho, se ha descrito que el TNF- α puede inducir la liberación de la IL-6, la cual estimula la síntesis de la PCR. Además, estas citoquinas pueden estimular la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B), el cual regula la expresión de varios genes asociados a la patogénesis de la enfermedad vascular tales como el factor tisular, molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), molécula de adhesión intracelular -1 (ICAM-1), IL-1, IL-6, IL-8. Por lo tanto, estos mediadores inflamatorios pueden llevar a la disfunción endotelial y contribuir con el proceso aterogénico; y la acumulación de lípidos en la íntima arterial está asociado con la formación de placas ateroscleróticas y

trombos (Schalkwijk y Stehouwer, 2005; Figueira y González, 2018).

Los efectos del péptido C sobre la inflamación, la diabetes y en la proliferación celular son controversiales. Por un lado, se ha descrito que el péptido C inhibe la interacción de leucocitos con el endotelio, pues es capaz de inhibir el rodamiento, adherencia y migración transendotelial de los leucocitos al endotelio, mediante una disminución de la expresión de moléculas de adhesión celular, como la selectina P e ICAM-1 en el endotelio microvascular y un aumento en la expresión de la eNOS (Scalia y col., 2000). Asimismo, la terapia de reemplazo con péptido C en pacientes con DMT1 ejerce un efecto beneficioso sobre el desarrollo de complicaciones micro vasculares (Ekberg y col., 2007). Contrariamente, diferentes estudios señalan a este péptido como una molécula pro inflamatoria; pues promueve la migración de leucocitos (Marx y col., 2004; Walcher y col., 2004) e induce la proliferación de diferentes células como las de músculo liso vascular y endoteliales (Walcher y col., 2006), pudiendo participar en diversos procesos inflamatorios. Efectivamente, la evidencia demuestra la expresión de depósitos de péptido C en el espacio subendotelial en aorta torácica de pacientes diabéticos (Marx y col., 2004), demostrando que el 77% mostró infiltración de monocitos/macrófagos y el 57% de linfocitos CD4⁺. De hecho, estudios *in vitro* reportan que el péptido C induce la migración de linfocitos CD4⁺ y monocitos/macrófagos; siendo dichos efectos similares a los inducidos por quimiocinas como la MCP-1 o RANTES, evidenciados a concentraciones fisiológicas de este péptido (1 nmol/L) (Marx y col., 2004; Walcher y col., 2004). Asimismo, se ha descrito un aumento en los niveles séricos de péptido C en pacientes con

DMT2 y en pacientes con resistencia a la insulina (Vasic y Walcher, 2012), lo cual se vio acompañado de disfunción endotelial, que pudo conllevar al depósito de péptido C en la íntima de la pared de los vasos. Así, los estudios *in vitro* demostraron que el péptido C tiene efecto quimiotáctico sobre células inflamatorias como monocitos/macrófagos y linfocitos CD4⁺; ejerciendo efecto sobre la proliferación de células de músculo liso en la media y favoreciendo procesos inflamatorios como la aterosclerosis (Marx y col., 2004; Walcher y col., 2004).

En apoyo a estos hallazgos, en el presente estudio se demostró la existencia de una asociación positiva del péptido C con marcadores proinflamatorios como PCR, IFN- γ , y eotaxina; y una correlación negativa con marcadores antiinflamatorios como IL-4, 5, 7, 10 y 13. Igualmente, se mostró una correlación positiva entre el colesterol y los marcadores pro inflamatorios, siendo mayor la asociación del colesterol con el péptido C que para las otras citocinas; lo cual sugiere que la hipercolesterolemia conlleva a un estado inflamatorio de bajo grado, por lo que los niveles séricos de péptido C podría constituir un marcador plasmático no invasivo de inflamación y de riesgo cardiovascular. Diversos estudios han correlacionado el péptido C con el proceso aterogénico. Efectivamente, estudios inmunohistoquímicos de arterias obtenidas de individuos quienes fallecieron por causas externas han mostrado depósitos de péptido C en la íntima y subendotelio de pacientes diabéticos, colocalizándose con monocitos CD68⁺ y macrófagos los cuales son los responsables de la fagocitosis de las LDL originando las células espumosas. De igual manera, se ha descrito que la administración subcutánea de péptido C (200 nmol) a ratones deficientes de

apolipoproteína E (ApoE) alimentados con una dieta enriquecida con colesterol, ocasionó un aumento en el depósito del péptido en la pared de la aorta y en las lesiones ateroscleróticas con respecto a los ratones controles no tratados (Apo E deficientes alimentados con una dieta enriquecida con colesterol). El depósito del péptido fue acompañado de un incrementado infiltrado inflamatorio y de depósitos de lípidos (Suzuki y col., 2001; Vasic y Walcher, 2012); por lo tanto, el incremento de la expresión del péptido C en la pared de vasos sanguíneos de ratones Apo E deficientes induce inflamación local que conlleva el depósito de lípidos y el incremento en la proliferación de células de músculo liso, procesos cruciales en la etiopatogenia de la aterosclerosis (Vasic y Walcher, 2012). Además, se ha demostrado que el péptido C es capaz de ocasionar *in vitro* a concentraciones fisiológicas (1 nmol/L) un incremento en la migración de monocitos, lo cual no fue ejercido por la insulina, sugiriendo el papel del péptido C en las primeras fases de la aterogénesis (Marx y col., 2004) y en la inflamación.

Algunos autores han descrito efectos beneficiosos del péptido C sobre la aterosclerosis (Alves y col., 2019). En efecto, altos niveles de glucosa en pacientes diabéticos activan la transcripción de factor NF-KB, el cual lleva a la proliferación de células del músculo liso vascular, y disminuye la captación de glucosa por las células. Asimismo, se ha descrito que bajo condiciones de alta glucosa, la administración de péptido C durante 3 semanas en cultivo de células de músculo liso de aorta de ratas reduce la expresión de proteínas del receptor PDGF, molécula relacionada al crecimiento celular y migración. Dicho efecto no se observó bajo condiciones de glucosa normal (Kobayashi y col.,

2005); y ocasionó una disminución en la proliferación celular con respecto a las no incubadas con péptido C, debido a la disminución de la translocación nuclear de NF-KB p65 y p50 (Cifarelli y col., 2008). Por lo tanto, los efectos beneficiosos del péptido C parecen estar asociados con condiciones de hiperglicemia y no de normoglicemia.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la hipercolesterolemia se encuentra asociada al incremento de los niveles plasmáticos de péptido C, el cual a su vez está asociado con marcadores pro-inflamatorios y metabólicos, pudiendo constituir un biomarcador útil de riesgo de enfermedad cardiovascular en la población venezolana.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el Ministerio Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV No. 2007001585, el Proyecto de Estímulo a la Investigación PEII-20122000760 y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico con el Proyecto CDCH PI-06-7368-2008-1 y CDCH-UCV AIA-06.8402.2012.

Referencias bibliográficas

- Abdullah Hasan, Raigangar V, Bani-Issa W. 2012. C-peptide versus Insulin: relationships with risk biomarkers of cardiovascular disease in metabolic syndrome in young arab females. *Int J Endocrinol* ID 420792.
- ADA (American Diabetes Association). 2017. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes care* 40(Suppl 1): S1–131.
- Alves M, Ortiz M, Oliveira Pimenta dos Reis G Sant'Ana Dusse L, Carvalho M, Fernandes A, Gomes K. 2019. The dual effect of C-peptide on cellular activation and atherosclerosis: protective or not?

- Diabetes Metab Res Rev 35(1): e3071. doi: 10.1002/dmrr.3071.
- Bhatt MP, Lim YC, Ha KS. 2014. C-peptide replacement therapy as an emerging strategy for preventing diabetic vasculopathy. *Cardiovasc Res* 104: 234–244.
- Cabrera A, Oliva JG, Marcelino I, Almeida D, Alemán J, Brito B, Domínguez S, Bertomeu V, Aguirre A, Rodríguez C. 2015. C-peptide as a risk factor of coronary artery disease in the general population. *Diab Vasc Dis Res* 12(3): 199–207.
- Chan WB, Tong PC, Chow CC, So WY, Ng MC. 2004. The associations of body mass index, C peptide and metabolic status in chinese Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 21(4): 349–353.
- Cifarelli V, Geng X, Styche A, Lakomy R, Trucco M, Luppi P. 2011. C-peptide reduces high-glucose-induced apoptosis of endothelial cells and decreases NAD(P)H-oxidase reactive oxygen species generation in human aortic endothelial cells. *Diabetologia* 54: 2702–2712.
- Cifarelli V, Luppi P, Tse HM, He J, Piganelli J, Trucco M. 2008. Human proinsulin C-peptide reduces high glucose-induced proliferation and NF- κ B activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 201: 248–257.
- Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464: 1357–1361.
- Ekberg K, Brismar T, Johansson BL, Lindstrom P, Juntti-Berggren L. 2007. C-peptide replacement therapy and sensory nerve function in type 1 diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 30(1): 71–76.
- Elbassuoni EA, Aziz NM, El-Tahawy NF. 2018. Protective effect of C-peptide on experimentally induced diabetic nephropathy and the possible link between C-peptide and nitric oxide. *Appl Physiol Nutr Metab* 43(6): 617–624.
- Ferroni P, Basili S, Davì G. 2003. Platelet activation, inflammatory mediators and hypercholesterolemia. *Curr Vasc Pharmacol* 1: 157–169.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. *Clín Invest Arteriosclerosis* 30(5): 209–216.
- Forst T, De La Tour DD, Kunt T, Pflutzner A, Goitom K, Pohlman T, Schneider S, Johansson BL, Wahren J, Lobig M, Engelbach M, Beyer J, Vague P. 2000. Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na⁺,K⁺-ATPase activity in diabetes mellitus type 1. *Clin Sci (Lond)* 98: 283–290.
- Ghorbani A, Shafiee-Nick R. 2015. Pathological consequences of C-peptide deficiency in insulin-dependent diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6: 145–150.
- IEC (International Expert Committee). 2009. International expert committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32: 1327–34.
- Jin-Young M, Kyoung-Bok M. 2013. Serum C-peptide levels and risk of death among adults without diabetes mellitus. *CMAJ* 185(9): E402–E408.
- Jones AG, Hattersley AT. 2013. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetes Med* 30:803–817.
- Kamiya H, Zhang W, Ekberg K, Wahren J, Sima AA. 2006. C-peptide reverses nociceptive neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 55(12): 3581–3587.
- Karunaratne W, Ku CJ, Spence DM. 2009. The dual nature of extracellular ATP as a concentration-dependent platelet P2X1 agonist and antagonist. *Integr Biol (Camb)* 1: 655–663.
- Kitamura T, Kimura K, Jung B. 2001. Proinsulin C peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G protein. *Biochem J* 355(1): 123–129.

- Kitamura T, Kimura K, Jung B. 2002. Proinsulin C peptide activates cAMP response element-binding proteins through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in mouse lung capillary endothelial cells. *Biochem J* 366(3): 737-744.
- Kobayashi Y, Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Akiyama N, Kamiya H, Watarai A, Nakae M, Oiso Y, Nakamura J. 2005. Human proinsulin C-peptide prevents proliferation of rat aortic smooth muscle cells cultured in high-glucose conditions. *Diabetologia* 48: 2396-2401.
- Kunt T, Schneider S, Pftzner A, Goitum K, Engelbach M, Schauf B, Beyer J, Forst T. 1999. The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 465-471.
- Laws A, Reaven GM. 1992. Evidence for an independent relationship between insulin resistance and fasting plasma HDL-cholesterol, triglyceride and insulin concentrations. *J Intern Med* 231: 25-30.
- Li Y, Li Y, Meng L, Zheng L. 2015. Association between serum C-peptide as a risk factor for cardiovascular disease and high-density lipoprotein cholesterol levels in nondiabetic individuals. *PLoS ONE* 10(1): e112281. doi: 10.1371/ journal.pone.0112281.
- Li Y, Meng L, Li Y, Sato Y. 2014. Associations of serum C-peptide level with body fat distribution and ever stroke in nondiabetic subjects. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23(3): e163-169.
- Lim YC, Bhatt MP, Kwon MH, Park D, Lee S, Choe J, Hwang J, Kim YM, Ha KS. 2014. Prevention of VEGF-mediated microvascular permeability by C-peptide in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 101: 155-164.
- Lim YC, Bhatt MP, Kwon MH, Park D, Na S, Kim YM, Ha KS. 2015. Proinsulin C-peptide prevents impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. *J Invest Dermatol* 135: 269-278.
- Marx N, Walcher D, Raichel C, Aleksic M, Bach H, Gru M, Hombach V, Libby P, Zieske A, Homma S, Strong J. 2004. C-peptide colocalizes with macrophages in early arteriosclerotic lesions of diabetic subjects and induces monocyte chemotaxis *in vitro*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 540-545.
- Min JY, Min KB. 2013. Serum C-peptide levels and risk of death among adults without diabetes mellitus. *CMAJ* 185(9): E402-408.
- Nevala R, Seppo L, Tikkanen MJ. 2000. Dietary fatty acid composition influences the degree of human LDL oxidation, but has only minor effects on vascular tone in a bioassay system. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10: 126-36.
- Nordquist L, Moe E, Sjoquist M. 2007. The C-peptide fragment EVARQ reduces glomerular hyperfiltration in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes Metabol Res Rev* 23(5): 400-405.
- Ohtomo Y, Bergman T, Johansson B, Jornvall H, Wahren J. 1998. Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na⁺, K⁺-ATPase activity of renal tubule segments. *Diabetologia* 41(3): 287-291.
- Qiao X, Zheng H, Zhang S, Liu S, Xiong Q, Mao F, Zhang Z, Wen J, Ye H, Li Y, Lu B. 2017. C-peptide is independent associated with diabetic peripheral neuropathy: a community-based study. *Diabetol Metab Syndr* 9: 12.
- Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen P, Eklund K. 2010. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5: e11765.
- Reaven GM. 2005. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med* 47(4): 201-210.
- Reaven GM. 2011. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 95(5): 875-892.
- Samnegard B, Jacobson SH, Jaremko G, Johansson BL, Ekberg K, Isaksson B, Eriksson L, Wahren J, Sjoquist M. 2005. C-peptide prevents glomerular hypertrophy and mesangial matrix expansion in diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* 20: 532-538.

- Scalia R, Coyle KM, Levine BJ, Booth G, Lefer AM. 2000. C-peptide inhibits leukocyte-endothelium interaction in the microcirculation during acute endothelial dysfunction. *Faseb J* 14(14): 2357–2364.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD. 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 109(2): 143–159.
- Seppo L, Karjala K, Nevala R. 2000. A long-term fish diet modifies the toxic properties of human partially oxidized LDL on vascular preparations *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 51: 251–65.
- Shaw JA, Shetty P, Burns KD, Fergusson D, Knoll GA. 2015. C-peptide as a therapy for kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 10(5): e0127439.
- Sjoquist M, Huang W, Johansson BL. 1998. Effects of C-peptide on renal function at the early stage of experimental diabetes. *Kidney Int* 54: 758–764.
- Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ. 1999. Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats *ex vivo* and *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 50: 629–637.
- Suzuki L, Poot M, Gerrity R, Bornfeldt K. 2001. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 50(4): 851–860.
- Vasic D, Walcher D. 2012. Proinflammatory effects of C-peptide in different tissues. *Int J Inflamm* 2012: 932725.
- Wahren J, Foyt H, Daniels M, Arezzo JC. 2016. Long-acting C-peptide and neuropathy in Type 1 Diabetes: a 12-month clinical trial. *Diabetes Care* 39(4): 596–602.
- Wahren J, Shafqat J, Johansson J, Chibalin A, Ekberg K, Jornvall H. 2004. Molecular and cellular effects of C-peptide. New perspectives on an old peptide. *Experimental Diab Res* 5: 15–23.
- Walcher D, Aleksic M, Jerg V, Hombach V, Zieske A, Homma S, Strong J, Marx N. 2004. C-peptide induces chemotaxis of human CD4-positive cells involvement of pertussis toxin-sensitive G-Proteins and phosphoinositide 3-Kinase. *Diabetes* 53: 1664–1670.
- Walcher D, Babiak C, Poletek P. 2006. C-peptide induces vascular smooth muscle cell proliferation: involvement of Src kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and extracellular signal regulated kinase 1, 2. *Circ Res* 99(11): 1181–1187.
- Wang J, Tan G, Han L, Bai Y, He M, Liu H. 2017. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *J Geriatr Cardiol* 14: 135–150.
- Wang S, Li G, Zuo H, Yang H, Ma L, Feng J, Niu Y, Ma L, Liu S, Qi T, Liu X. 2019. Association of insulin, C-peptide and blood lipid patterns in patients with impaired glucose regulation. *BMC Endocrine Disorders* 19: 75.
- WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 1975 y revisada en 1983).
- Zhong Z, Kotova O, Davidescu A. 2004. C-peptide stimulates Na⁺,K⁺-ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinases in human renal tubular cells. *Cell Mol Life Sci* 61(21): 2782–2790.