



## El ion manganeso como agente pro-angiogénico en la disfunción endotelial diabética

Agustín Boixart<sup>1</sup>, Juan Sebastián Sar<sup>2</sup>, María Marta Bonaventura<sup>3</sup>, Luis Alberto Haro Durand<sup>4\*</sup>

1. Servicio de Ginecología y Mastología, Hospital Alemán, Avenida Pueyrredón 1640, Capital Federal (1118), Buenos Aires-Argentina.
2. Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Naval “Dr. Pedro Mallo”, Avenida Patricias Argentinas 351, Capital Federal (1405), Buenos Aires-Argentina.
3. Escuela de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Avenida 25 de Mayo 1169, San Martín (1650), Buenos Aires-Argentina.
4. Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Vuelta de Obligado 2490, Capital Federal (1428), Buenos Aires.

\*E-mail: [harodurand.luis@gmail.com](mailto:harodurand.luis@gmail.com)

### PALABRAS CLAVES

Ion Manganeso (Mn<sup>2+</sup>)  
Disfunción Endotelial  
Angiogénesis  
Hiperglucemia

### RESUMEN

La disfunción endotelial inducida por hiperglucemia crónica es un factor clave en las complicaciones vasculares de la diabetes. En este estudio se evaluó el potencial pro-angiogénico del ion manganeso (Mn<sup>2+</sup>) sobre cultivos de células endoteliales humanas (HUVECs) sometidas a condiciones de hiperglucemia (30 mmol/L de D-glucosa durante 7 días). Se realizaron ensayos de proliferación, migración, tubulogénesis y análisis de la expresión de marcadores mitogénicos y apoptóticos. Los resultados mostraron que el tratamiento con 100 µmol/L de Mn<sup>2+</sup> aumentó significativamente la proliferación y migración celular. Además, el ion promovió la formación de estructuras tubulares sobre Geltrex™ en condiciones de hiperglucemia, superando en un 300% la capacidad observada en normoglucemia. El tratamiento también incrementó los niveles de pERK, un marcador mitogénico y disminuyó los niveles de Bax y caspasa-3 clivada, marcadores pro-apoptóticos. En conclusión, el ion Mn<sup>2+</sup> mostró potencial para revertir la disfunción endotelial y promover la angiogénesis en condiciones hiperglucémicas. Esto sugiere que el ion Mn<sup>2+</sup> podría ser utilizado en estrategias terapéuticas regenerativas para enfermedades vasculares relacionadas con la diabetes.

## Manganese ion as a pro-angiogenic agent in diabetic endothelial dysfunction

### KEYWORDS

Manganese Ion (Mn<sup>2+</sup>)  
Endothelial Dysfunction  
Angiogenesis  
Hyperglycemia

### ABSTRACT

Chronic hyperglycemia-induced endothelial dysfunction is a key factor in the vascular complications of diabetes. In this study we evaluated the pro-angiogenic potential of manganese ion (Mn<sup>2+</sup>) on cultured human endothelial cells (HUVECs) subjected to hyperglycemia conditions (30 mmol/L D-glucose for 7 days). Proliferation, migration, tubulogenesis and analysis of the expression of mitogenic and apoptotic markers were performed. The results showed that treatment with 100 µmol/L Mn<sup>2+</sup> significantly increased cell proliferation and migration. In addition, the ion promoted the formation of tubular structures on Geltrex™ under hyperglycemia conditions, exceeding by 300% the capacity observed in normoglycemia. The treatment also increased the levels of pERK, a mitogenic marker, and decreased the levels of Bax and cleaved caspase-3, pro-apoptotic markers. In conclusion, Mn<sup>2+</sup> ion showed potential to reverse endothelial dysfunction and promote angiogenesis under hyperglycemic conditions. This suggests that Mn<sup>2+</sup> ion could be used in regenerative therapeutic strategies for diabetes-related vascular diseases.

## 1. Introducción

La angiogénesis es un proceso biológico mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, y juega un papel fundamental en la reparación de tejidos, la cicatrización de heridas y el desarrollo de órganos. Además, también está involucrada en procesos patológicos como el crecimiento tumoral y las enfermedades cardiovasculares (Carmeliet, 2011; Okonkwo y DiPietro, 2017; Ambrose, 2017).

La hiperglucemia crónica es un factor clave en la disfunción endotelial observada en pacientes diabéticos (Kolluru et al., 2012; Okonkwo y DiPietro, 2017; Clyne, 2021). A concentraciones elevadas de glucosa (>25 mmol/L), las células endoteliales experimentan estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y activación de vías de señalización proinflamatorias (Clyne, 2021; Baldassarre et al., 2021; An et al., 2023). Dicho entorno, provoca una reducción de la capacidad de proliferación y migración, junto con una alteración en la producción de factores de crecimiento, como el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), y la inducción de apoptosis. Estas condiciones recrean un escenario similar al de la microangiopatía diabética (Madonna et al., 2017; Oliveira Volpe et al., 2018; Al-Kharashi, 2018).

En este sentido, el desarrollo e investigación de nuevas sustancias bioactivas que permitan restaurar la integridad vascular en pacientes diabéticos mediante la modulación del estrés oxidativo y la promoción de la angiogénesis, y que reúnan las características de ser seguras, efectivas y accesibles, constituye un área de investigación que se encuentra en crecimiento (Sena et al., 2018; Fadilah et al., 2023; Perez-Araluce et al., 2024; Jin y Kan, 2024). Los iones bioactivos son átomos o moléculas (aniones o cationes), que dentro de cierto rango de concentración tienen la capacidad de estimular respuestas celulares y moleculares clave que regulan la expresión génica, la activación de vías de señalización y el control del ciclo celular. Estos iones desempeñan un papel muy importante en una variedad de procesos fisiológicos, incluida la formación de huesos, la reparación de tejidos y la respuesta inmunológica. A menudo se incorporan en biomateriales como implantes, materiales de relleno y/o matrices biopoliméricas para mejorar sus propiedades biológicas o la interacción de los materiales con los tejidos (Mouriño et al., 2012; Lin et al., 2019; Pantulap et al., 2022).

El manganeso (Mn) es un metal de transición presente en cantidades trazas en el organismo y cumple funciones biológicas cruciales como la regulación de la glucosa en sangre, el balance energético y el desarrollo óseo. Debido a su naturaleza química, el ion  $Mn^{2+}$  actúa como cofactor esencial de la enzima mitocondrial superóxido dismutasa (MnSOD), que convierte el superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual posteriormente es degradado por catalasas o peroxidasas (Culotta y Daly, 2013; Chen et al., 2015). Si bien se ha propuesto que el ion  $Mn^{2+}$  tendría función en procesos de reparación de tejidos (Hreha et al., 2015; Barrioni et al., 2019; Westhauser et al., 2020, Pantulap et al., 2022), los trabajos relacionados son escasos y aun no existen estudios que evalúen el potencial pro-angiogénico en modelos *in vitro* que reproduzcan las condiciones de hiperglucemia crónica que experimentan los pacientes diabéticos.

Dentro de este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial pro-angiogénico del ion  $Mn^{2+}$  en cultivos de células endoteliales HUVECs crecidas en condiciones de hiperglucemia crónica.

## 2. Materiales y métodos

### *Cultivo de células endoteliales*

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs, del inglés Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Las HUVECs fueron cultivadas entre los repiques +3 y +8 en frascos T75 (156800, Thermo Fisher Scientific) en medio M199 (M5017, Sigma-Aldrich) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (M199+10% SFB) y 50  $\mu$ g/mL de gentamicina, suplementado con bFGF y VEGF en una concentración final de 2 ng/mL y 10 ng/mL respectivamente y mantenidas en incubadora gaseada con 5% de  $CO_2$  en aire a 37°C.

### *Establecimiento del modelo *in vitro* de hiperglucemia*

Las células HUVECs fueron sembradas en placas de cultivo de 10 mm de diámetro (664160 Grainer-Bio One) y cultivadas durante 7 días en medio de cultivo M199+10% SFB suplementado con alta concentración de glucosa (condición de hiperglucemia: HG = 30 mmol/L de D-glucosa) (608203, Sigma-Aldrich) o con baja concentración de glucosa (condición de normoglucemia: NG = 5,5 mmol/L de D-glucosa) (Ido et al., 2002; Zhang et al., 2016; Sayed et al., 2023; Wang et al., 2024). Luego de 7 días de incubación, las células fueron lavadas,

tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer y utilizadas para los ensayos propuestos. Como control osmótico se utilizaron células HUVECs crecidas durante 7 días con 30 mmol/L de D-manitol (M4124, Sigma-Aldrich).

#### *Fuente de iones Mn<sup>2+</sup>*

Como fuente de iones Mn<sup>2+</sup>, se utilizó cloruro de manganeso (MnCl<sub>2</sub>) comercializado por la empresa Merck (244589, Sigma-Aldrich). Como primer paso, se obtuvo una solución stock de 100 mmol/L de MnCl<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O destilada. A partir de esta solución se condicionó el medio de cultivo M199 en todos los ensayos. Teniendo en cuenta que la concentración de Cl<sup>-</sup> en el medio de cultivo M199 base es de 0,12 mol/L, consideramos que la cantidad de Cl<sup>-</sup> aportada por el MnCl<sub>2</sub> al medio M199 en los distintos ensayos, fue mínima y no tuvo impacto significativo en los resultados.

#### *Ensayos de citotoxicidad*

Se sembraron 10.000 células HUVECs por pocillo en placa de 96 pocillos (greiner BIO ONE 651180) en 100 µL de M199 con 2% de SFB (M199+2% SFB). Una vez alcanzada la adherencia total de las células a la superficie de los pocillos, el medio fue removido y reemplazado con medio M199+10% SFB suplementado con concentraciones crecientes de MnCl<sub>2</sub> entre 0 y 300 µmol/L. Luego de 24 horas se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y los mismos se utilizaron para detectar mediante un kit comercial, lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo (CyQUANTTM LDH Cytotoxicity Assay Kit, Invitrogen-C20300).

#### *Ensayo de proliferación*

Células HUVECs crecidas en condiciones de hiperglucemia fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 8.000 células/pocillo, en 100 µL de medio M199 con 2% de SFB. Luego de 12 horas, se removió el medio y las células fueron tratadas durante 48 horas con 150 µL de M199+10% SFB suplementado con diferentes concentraciones de MnCl<sub>2</sub> de entre 0 y 200 µmol/L. Luego de las primeras 24 horas, se añadieron 25 µL por pocillo de medio M199+10% SFB, conteniendo metil-[3H]-timidina a una concentración final 2,5 µCi/mL. El ensayo se detuvo a las 24 horas mediante la adición de 50 µL de cloruro de guanidinio 6M y las células se lisaron completamente mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. El ADN celular fue recogido con filtros Whatman GFC mediante un cosechador (Cell Harvester 8, Nunc), fijado con etanol 96%, secado al aire y la radioactividad

incorporada, se determinó en presencia de 1 mL de solución centelladora (OptiPhase Hi Fase 3, Wallac Scintillation Products) en un contador de centelleo líquido (Packard 1600 TR, Canberra Company).

#### *Ensayo de Migración*

Células HUVECs/HG fueron sembradas a confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos (greiner BIO ONE 662160) en M199 con 2% de SFB. Luego de asegurada su adherencia a la superficie de los pocillos, se realizó una “herida” con una punta de tip. Las células fueron lavadas tres veces con PBS para remover restos celulares y células desprendidas y se cultivaron durante 8 h en medio M199+10% SFB suplementado con 100 µmol/L de MnCl<sub>2</sub>. Se tomaron imágenes fotográficas inmediatamente luego de realizada la “herida” a las 0 horas y luego de 8 horas. La migración celular fue cuantificada utilizando un analizador de imágenes (Image J). El promedio del área de la “herida” se expresó como el porcentaje de recubrimiento (% R) de 3 pocillos tratados de la misma manera usando la ecuación (1):

$$\% R = [1 - (T_t/T_0)] \times 100$$

donde T<sub>0</sub> es el área de la “herida” a las 0 horas y T<sub>t</sub> es el área de la “herida” a las 8 horas. Como control absoluto se utilizaron HUVECs crecidas en condiciones de normoglucemia y como control positivo se utilizaron HUVECs crecidas en condiciones de hiperglucemia y tratadas con 10 ng/mL de VEGF.

#### *Ensayo de tubulogénesis*

Para el ensayo de tubulogénesis, 60 µL de Geltrex™, reducido en factores de crecimiento, (A1569601, Thermo Fisher Scientific) fueron colocados por pocillo en placas de 96 pocillos. Luego, la placa se incubó durante 30 minutos a 37° C para facilitar la solidificación de la matriz. Luego de la solidificación, se sembraron 10.000 células HUVECs crecidas en condiciones de hiperglucemia sobre la superficie de la matriz en 150 µL de M199+10% SFB suplementado con 100 µmol/L de MnCl<sub>2</sub>. El ensayo fue monitoreado cada 2 horas durante un periodo de 6 horas. Al final del ensayo, las células fueron analizadas bajo microscopía óptica y se tomaron fotografías de 3 áreas dentro del pocillo. Usando el programa ImageJ se cuantificó el número de estructuras tubulares completamente formadas en cada área fotografiada. Como control absoluto se utilizaron HUVECs crecidas en condiciones de normoglucemia y como control positivo se utilizaron HUVECs crecidas en condiciones de hiperglucemia y tratadas con 10 ng/mL de VEGF.

### Western blot

Monocapas de células HUVECs/HG fueron estimuladas durante 24 horas con M199+10% SFB suplementado con 100  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{MnCl}_2$ . Luego de 24 horas las células fueron homogenizadas en 1X SDS sample buffer (composición: 62,5 mM Tris-HCl, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0,01% w/v bromophenol blue). 30  $\mu\text{L}$  de muestra fueron cargadas en un gel de poliacrilamida y corridas en buffer 0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS en una celda de electroforesis (Mini-Protean® II, Bio-Rad). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Biosciences 0.45  $\mu\text{m}$  RPN303D) a 100 V, durante 1 h a 4°C en una celda de transferencia electroforética (Mini-Trans-Blot, Bio-Rad). Luego de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas 1 hora a temperatura ambiente en buffer tris con 5% (p/v) de leche descremada en polvo y 0.05 % (v/v) de Tween-20. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente anti-pERK (#9101, Cell Signaling Technology), anti-ERK (#9102, Cell Signaling Technology), anti-caspasa 3 clivada (#9661, Cell Signaling Technology), anti-caspasa 3 (sc-271028, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bax (sc-70408, Santa Cruz Biotechnology) y anti- $\beta$ -tubulin (ab179513, abcam). Como control de peso molecular se utilizó el ECL-Rainbow Marker-Full range (GERPN800E, Amersham). La detección se llevó a cabo con el anticuerpo secundario anti-conejo (PI-1000-1, Vector Laboratories) o anti-ratón (PI-2000-1, Vector Laboratories) conjugados a peroxidasa y en presencia de una solución quimioluminiscente sustrato de la peroxidasa (ECLTM, Amersham Biosciences). Como control positivo se utilizaron HUVECs crecidas en condiciones de hiperglucemia y tratadas con 10 ng/mL de VEGF.

### Análisis estadístico

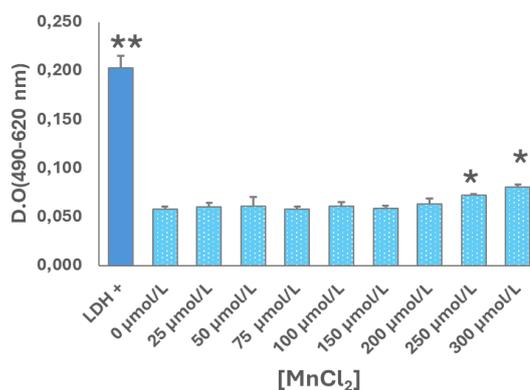
Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente suponiendo un  $\alpha=0,05$  y  $\beta=0,10$ . Para todos los datos se calculó el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los resultados fueron analizados mediante prueba de t-student y análisis de la varianza (ANOVA) y como prueba post-hoc se utilizó la de Bonferroni.

## 3. Resultados y Discusión

### Rango de concentración no citotóxico del ion $\text{Mn}^{2+}$

Para determinar el rango de concentración no citotóxico del ion  $\text{Mn}^{2+}$ , las células HUVECs fueron

tratadas con concentraciones crecientes de  $\text{MnCl}_2$  entre 0 y 300  $\mu\text{mol/L}$ . Como se observa en la Figura 1, la actividad de LDH en el medio de cultivo permaneció invariable entre las concentraciones de 0 a 200  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{MnCl}_2$ . Sin embargo, a 250  $\mu\text{mol/L}$  se observó un aumento significativo de un 25% en la actividad de LDH ( $p < 0,05$ ) tras 24 horas de tratamiento. Con base en estos resultados, se definió como rango de concentración no citotóxico para el ion  $\text{Mn}^{2+}$  aquel entre 0 y 200  $\mu\text{mol/L}$ . Este intervalo se encontró por debajo de las concentraciones citotóxicas descritas en bibliografía y por encima de la concentración normal de  $\text{Mn}^{2+}$  en sangre (Milatovic et al., 2007; Peres et al., 2013; O'Neal & Zheng, 2015). Este ensayo muestra que el ion  $\text{Mn}^{2+}$  es bien tolerado por las células HUVECs en concentraciones de hasta 200  $\mu\text{mol/L}$ . A 250  $\mu\text{mol/L}$ , se observa un aumento significativo del 25% en la actividad de LDH, indicando posible citotoxicidad a dosis más altas. Sin embargo, es importante destacar que la actividad de LDH en concentraciones superiores a 200  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{MnCl}_2$ , sigue siendo relativamente baja en comparación con el control positivo (tratamiento con agente lítico: LDH+).



**Figura 1:** Niveles promedio de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo tras 24 horas de tratamiento con  $\text{Mn}^{2+}$  en diferentes concentraciones de  $\text{MnCl}_2$ . Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. (\* $p < 0,05$ ) indica un aumento significativo en la actividad de LDH comparado con el control (0  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{MnCl}_2$ ). (\*\* $p < 0,01$ ) indica un aumento altamente significativo comparado con el control (0  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{MnCl}_2$ ).

### Proliferación celular bajo condiciones de hiperglucemia y efecto del ion $\text{Mn}^{2+}$

Se postula que el aumento en las especies reactivas del oxígeno (ROS) inducido por hiperglucemia crónica contribuye significativamente a la disfunción endotelial al inhibir la proliferación y migración celular, atenuar la respuesta a factores de crecimiento y promover la expresión de marcadores pro-apoptóticos (Ido et al., 2002; Thomson et al.,

2006; Yu et al., 2006; Arya et al., 2012; Moriya y Ferrara, 2014).

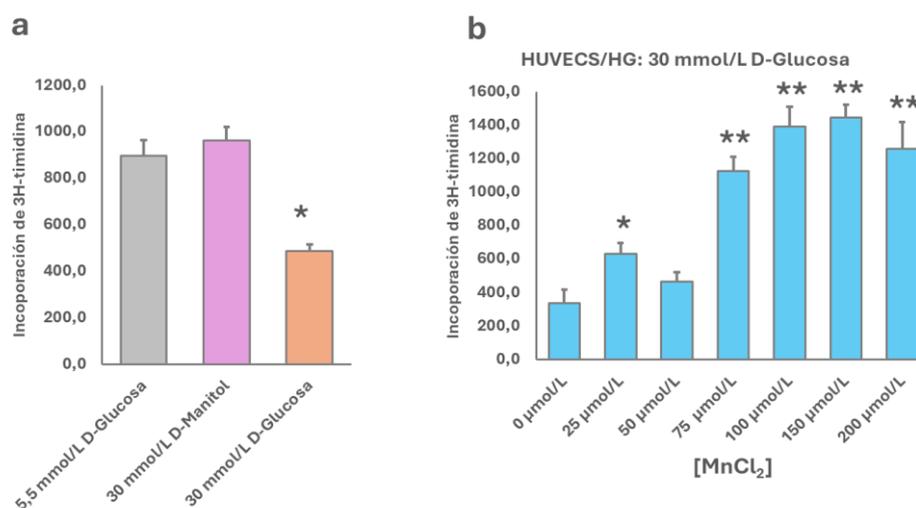
En nuestro estudio, HUVECs tratadas durante 7 días con 30 mmol/L de D-glucosa presentaron una reducción significativa del 50% en la proliferación basal en comparación con las células crecidas en condiciones de normoglucemia (5,5 mmol/L de D-Glucosa) ( $p < 0,05$ ) (Figura 2a). Esta respuesta refleja los efectos nocivos específicos de la glucosa ya que el control osmótico con 30 mmol/L de D-Manitol no mostró alteración de la proliferación basal.

Para explorar el posible efecto pro-angiogénico del ion  $Mn^{2+}$  en el contexto de hiperglucemia, las células HUVECs fueron expuestas a concentraciones crecientes de  $MnCl_2$  (0 a 200  $\mu\text{mol/L}$ ) durante 48 horas. Luego se evaluó la proliferación celular mediante incorporación metil-[ $^3\text{H}$ ]-timidina. Como muestra la figura 2b, se observó una respuesta proliferativa dependiente de la dosis, con aumento significativo entre 75 y 200  $\mu\text{mol/L}$  de  $MnCl_2$

( $p < 0,01$ ), siendo 100  $\mu\text{mol/L}$  una concentración óptima dentro del rango no citotóxico.

Los resultados confirman que la hiperglucemia crónica tiene un efecto negativo sobre la proliferación de células endoteliales, alineándose con estudios previos que demuestran que esta condición genera disfunción endotelial (Hink et al., 2003; Kolluru et al., 2012; Dymkowska et al., 2014). La ausencia de efecto en el control osmótico sugiere que la inhibición de la proliferación es consecuencia directa de los efectos metabólicos de la glucosa y no de la presión osmótica.

En cuanto al ion  $Mn^{2+}$ , la concentración de 100  $\mu\text{mol/L}$  no solo resultó ser biológicamente activa, sino que también mostró capacidad para promover la proliferación celular bajo condiciones de hiperglucemia. Este hallazgo sugiere un posible efecto pro-angiogénico aunque es necesario evaluar con más detalles los mecanismos involucrados a nivel molecular (Barrioni et al., 2019; Westhauser et al., 2020).



**Figura 2:** (a): Respuesta proliferativa de las células HUVECs pretratadas durante 7 días con 30 mmol/L de D-glucosa o D-manitol (control osmótico). Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (\* $p < 0,05$  en comparación con 5,5 mmol/L de D-glucosa). (b): Respuesta proliferativa de HUVECs en condiciones de hiperglucemia tratadas durante 48 horas con concentraciones crecientes de  $MnCl_2$  dentro del rango no citotóxico. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  en comparación con el control 0  $\mu\text{mol/L}$  de  $MnCl_2$ ).

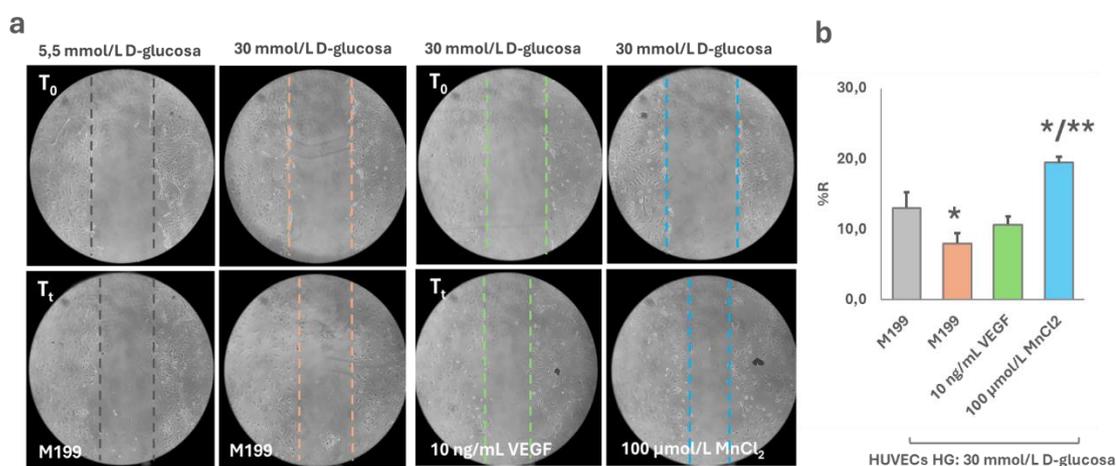
#### *Efecto del ion $Mn^{2+}$ sobre la migración celular en condiciones de hiperglucemia*

Para evaluar si el tratamiento con  $Mn^{2+}$  puede modular la migración de células HUVECs en

condiciones de hiperglucemia, se realizó un ensayo de herida y se determinó el porcentaje de recubrimiento (%R) después de 8 horas de tratamiento. Como se muestra en la Figura 3, el pretratamiento de células HUVECs con 30 mmol/L de

D-Glucosa durante 7 días redujo significativamente el %R basal en comparación con las células crecidas en condiciones de normoglucemia (5,5 mmol/L de D-Glucosa) con una disminución aproximada del 40% ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, esta reducción fue revertida tras 8 horas de tratamiento con 100  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Mn}^{2+}$ , logrando un %R superior al 100% en comparación con las células HUVECs en condiciones de hiperglucemia no tratadas ( $p < 0,01$ ). Como control positivo, el tratamiento con VEGF incrementó el %R en un 25% respecto a las células hiperglucémicas no tratadas; sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo (Figura 3).

Nuestros resultados sugieren que el ion  $\text{Mn}^{2+}$  promueve la migración de células HUVECs expuestas a hiperglucemia, lo que es relevante dado que la capacidad migratoria de las células endoteliales se ve comprometida bajo un estado de hiperglucemia crónica (Kang et al., 2017; Sena et al., 2018; Wang et al., 2021). Este hallazgo refuerza nuestra hipótesis de que el  $\text{Mn}^{2+}$  tendría potencial pro-angiogénico al facilitar la migración celular, un proceso esencial para la formación de nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis (Chebassier et al., 2004).



**Figura 3:** (a): Microfotografías que muestran el área de la herida al tiempo 0 y tras 8 horas de tratamiento con 100  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Mn}^{2+}$ . Nótese el mayor recubrimiento del área de la herida en las células tratadas con el ion en comparación con los controles. M.O. 100X. (b): El gráfico de barras representa el porcentaje promedio de recubrimiento del área de la herida después de 8 horas de tratamiento. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (\* $p < 0,05$  en comparación con el grupo normoglucémico, \*\* $p < 0,01$  en comparación con el grupo hiperglucémico no tratado).

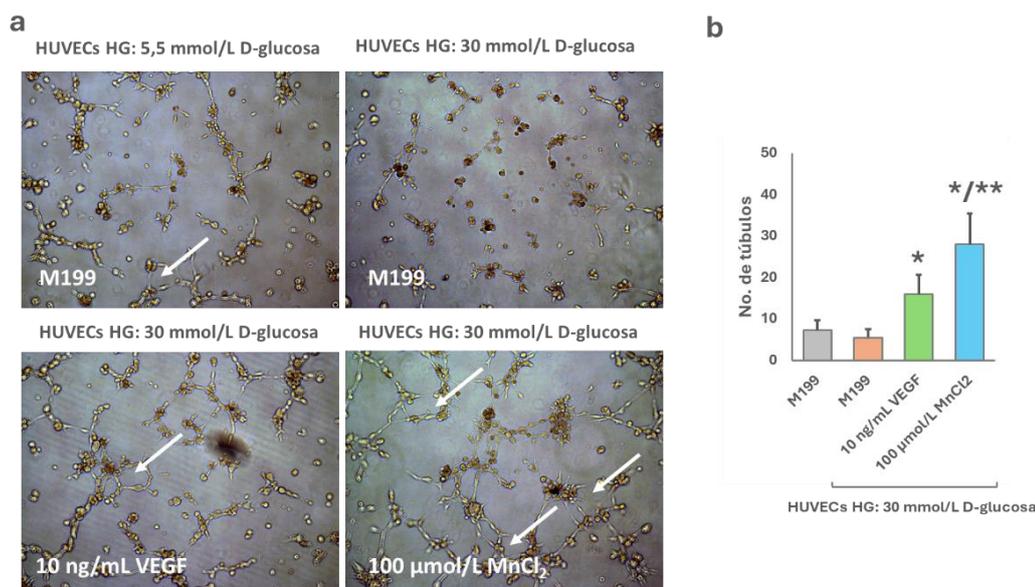
#### Efecto del ion $\text{Mn}^{2+}$ sobre la tubulogénesis en condiciones de hiperglucemia

El ensayo de tubulogénesis en matrices 3D (como el Geltrex™) es un modelo *in vitro* ampliamente utilizado para estudiar la formación de estructuras capilares por células endoteliales como las HUVECs. En este ensayo, las células se siembran en una matriz rica en laminina y colágeno tipo IV y, bajo la estimulación adecuada, se organizan en redes tubulares en 4 a 6 horas. Este ensayo permite evaluar el efecto de diferentes compuestos en la angiogénesis al cuantificar el número de estructuras tubulares completamente formadas (DeCicco-Skinner et al., 2014). En nuestras condiciones experimentales la condición de hiperglucemia (7

días, 30 mmol/L de D-Glucosa) fue suficiente para disminuir la formación de estructuras tubulares en un 25% ( $p > 0,05$ ) en comparación con la condición de normoglucemia (7 días, 5,5 mmol/L de D-Glucosa). Sin embargo, bajo tratamiento con el ion  $\text{Mn}^{2+}$  la formación de estructuras tubulares se incrementa significativamente un 400% ( $p < 0,01$ ) superando incluso a la condición de normoglucemia en un 300% más ( $p < 0,05$ ). El tratamiento control con VEGF también incrementó significativamente la formación de estructuras tubulares en la condición de hiperglucemia. Este incremento fue del 200% ( $p < 0,05$ ) superando, también, a la condición de normoglucemia en un 100% más (Figura 4).

Estos resultados destacan la capacidad del ion  $Mn^{2+}$  para promover la formación de estructuras vasculares en condiciones de hiperglucemia. El incremento del 400% más en la formación de estructuras vasculares sugiere que el  $Mn^{2+}$  podría compensar la disfunción endotelial inducida por hiperglucemia al potenciar la proliferación y

migración celular. El efecto pro-angiogénico del  $Mn^{2+}$  es comparable al observado con VEGF. Esto subraya su potencial en estrategias terapéuticas para estimular la angiogénesis bajo condiciones de hiperglucemia como la que experimentan los pacientes diabéticos.



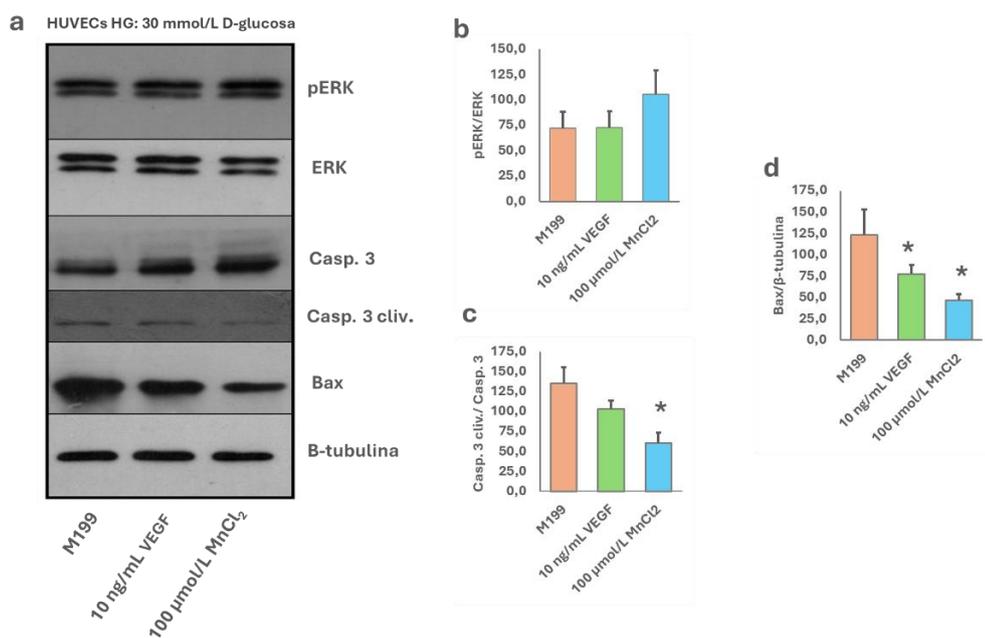
**Figura 4:** (a): Las microfotografías muestran la formación de estructuras tubulares sobre una matriz Geltrex<sup>TM</sup> después de 6 horas de tratamiento. Nótese la mayor formación de estructuras tubulares para la condición de hiperglucemia trata con el ion  $Mn^{2+}$ . (b): El gráfico de barras representa el promedio del número de estructuras tubulares completamente formadas (flechas blancas) después de 6 horas de tratamiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (\* $p < 0,05$  en comparación con la condición de normoglucemia, \*\* $p < 0,01$  en comparación con la condición de hiperglucemia).

#### Efecto del ion $Mn^{2+}$ sobre la expresión de marcadores de proliferación y apoptosis en condiciones de hiperglucemia

Para evaluar si el ion  $Mn^{2+}$  afecta la proliferación y apoptosis en células HUVECs expuestas a hiperglucemia, se analizaron tres marcadores: (1) pERK como marcador mitogénico, (2) Bax como regulador pro-apoptótico, y (3) caspasa-3 clivada como ejecutor de apoptosis. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento con 100 μmol/L de  $Mn^{2+}$  incrementó los niveles de pERK en un 40% ( $p > 0,05$ ) en comparación con la condición de hiperglucemia sin tratamiento, mientras que el VEGF no mostró cambios significativos (Fig. 5a, 5b). El ion  $Mn^{2+}$  disminuyó significativamente la expresión de Bax y caspasa-3 clivada en un 60% y 30%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). El tratamiento con VEGF también redujo

la expresión de Bax en 30% ( $p < 0,05$ ) y de caspasa-3 clivada en 25% ( $p > 0,05$ ) comparado con la condición de hiperglucemia sin tratamiento (Fig. 5a, 5c-d).

Estos resultados sugieren que el ion  $Mn^{2+}$  modularía tanto la proliferación como la apoptosis en células endoteliales expuestas a hiperglucemia, promoviendo una respuesta mitogénica a través del aumento de pERK y reduciendo la expresión de los marcadores apoptóticos Bax y caspasa-3 clivada. Esto sugiere que el  $Mn^{2+}$  tendría potencial pro-angiogénico en condiciones que normalmente inhibirían la formación de nuevos vasos. La reducción de Bax y caspasa-3 clivada refleja un efecto similar al del VEGF, reforzando la hipótesis de que  $Mn^{2+}$  podría ser utilizado en terapias angiogénicas, especialmente en pacientes diabéticos.



**Figura 5:** (a): Densitometrías de bandas para la expresión relativa de pERK, Bax y caspasa-3 clivada luego de 24 horas de tratamiento con el ion  $Mn^{2+}$ . 5b-c: Gráficos de barras para la expresión relativa de pERK (b), la expresión relativa de caspasa-3 clivada (c) y la expresión relativa de Bax (d). Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (\* $p < 0,05$  en comparación con la condición de hiperglucemia sin tratamiento). (Casp. 3: caspasa 3, Casp. 3 cliv.: caspasa-3 clivada).

#### 4. Conclusiones

Nuestros hallazgos demuestran que el ion  $Mn^{2+}$  tiene un impacto significativo en la recuperación de la función endotelial en condiciones de hiperglucemia crónica, promoviendo la proliferación, la migración celular y reduciendo los marcadores de apoptosis, como Bax y caspasa-3 clivada. Estos efectos sugieren un potencial pro-angiogénico del  $Mn^{2+}$ , comparable al de VEGF, lo que lo posicionaría como un agente terapéutico inorgánico factible de ser utilizado para tratar las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes.

#### 5. Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Alberto Baldi y al Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular del IBYME-CONICET, donde se originó el proyecto y se llevaron a cabo los experimentos. Agradecemos también al Dr. Alejandro Gorustovich por sus aportes en reparación y angiogénesis, así como el apoyo brindado durante este trabajo. Reconocemos el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MINCYT) y del FONCYT mediante el proyecto PICT-2018-01777. Finalmente, agradecemos a nuestros colegas por sus comentarios críticos que ayudaron a mejorar este manuscrito.

#### 6. Referencias

- Al-Karashi, A.S. (2018). Role of Oxidative Stress, Inflammation, Hypoxia and Angiogenesis in the Development of Diabetic Retinopathy, *Saudi J Ophthalmol* 32(4), 318-323.
- Ambrose, C.T. (2017). Pro-Angiogenesis Therapy and Aging: A Mini-Review, *Gerontology* 63(5), 393-400.
- An, Y.; Xu, B.T.; Wan, S.R.; Ma, X.M.; Long, Y.; Xu, Y.; Jiang, Z.Z. (2023). The Rol of oxidative Stress in Diabetes Mellitus-Induced Vascular Endothelial Dysfunction, *Cariovasc Diabetol* 22(1), 237.
- Arya, A.K.; Tripathi, R.; Kumar, S.; Tripath, K. (2012). Recent Advances on the Association of Apoptosis in Chronic Non-Healing Diabetic Wound, *Diabetes Complications* 26(6):554-561.
- Baldassarre, M.P.A.; Pipino, C.; Pandolfi, A.; Consoli, A.; Di Pietro, N.; Formoso, G. (2021). Old and New Biomarkers Associated with Endothelial Dysfunction in Chronic Hyperglycemia, *Oxid Med Cell Longev*, 2021:7887426.
- Barrioni, B.R.; Norris, E.; Li, S.; Naruphontjirakul, P.; Jones, J.R.; Pereira, M. (2019). Osteogenic Potential of Sol-Gel Bioactive Glasses

- Containing Manganese. *J Mater Sci Mater Med*, 2019; 30:86.
- Carmeliet, P.; Jain, R.K. (2011). Molecular Mechanism and Clinical Applications of Angiogenesis, *Nature* 473(6), 873-887
- Chen, P.; Chakraborty, S.; Peres, T.V.; Bowman, A.B.; Aschner, M. (2015). Manganese-Induced Neurotoxicity: From *C. elegans* to Humans, *Toxicol Res (Camb)* 4(2):191-202.
- Chebassier, N.; Oujija, E.H.; Viegas, I.; Dreno, B. (2004). Stimulatory Effect of Boron and Manganese Salt on Keratinocyte migration, *Acta Derm Venereol* 84(3), 191-4.
- Clyne, A.M.; (2021). Endothelial Response to Glucose: Dysfunction, Metabolism, and Transport, *Biochem Soc Trans* 49(1), 313-325.
- Culotta, V.C.; Daly, M.J. (2013). Manganese Complexes: Diverse Metabolic Routes to Oxidative Stress Resistance in Prokaryotes and Yeast, *Antioxid Redox Signal* 19(9):933-44.
- DeCicco-Skinner, K.L.; Henry, G.H.; Cataisson, C.; Tabib, T.; Gwilliam, J.C.; Watson, J.; Bullwinkle, E.M.; Falkenburg, L.; O'Neill, R.C.; Morin, A.; Wiest, J.S. (2014). Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis.
- Dymkowska, D.; Drabarek, B.; Podsiwyalow, B.; Szczepanowska, J.; Zablocki, K. (2014). Hyperglycaemia Modifies Energy Metabolism and Reactive Oxygen Species Formation in Endothelial Cells In Vitro, *Arch Biochem Biophys* 542:7-13.
- Fadilah N.I.; Phang, S.J.; Kamaruzaman, N.; Salleh, A.; Zawani, M.; Sanyal, A.; Fauzi, B. (2023). Antioxidant Biomaterials in Cutaneous Wound Healing and Tissue Regeneration: A Critical Review, *Antioxidants (Basel)* 12(4), 787.
- Hink, U.; Tsilimingas, N.; Wendt, M.; Münzel, T. (2003). Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus: Therapeutic Implications, *Treat Endocrinol* 2003; 2(5)293-304.
- Hreha, J.; Wey, A.; Cunningham, C.; Krell, E.S.; Brietbart, E.A.; Paglia, D.N.; Nicholas, J.; Montemurro, N.J.; Nguyen, D.A.; Lee, Y.J.; Komlos, D.; Lim, E.; Benevenia, J.; O'Connor, J.P.; Lin, S.S. (2015). Local Manganese Chloride Treatment Accelerates Fracture Healing in a Rat Model, *J Orthop Res* 33(1):122-30.
- Ido, Y.; Carling, D.; Ruderman, N. (2002). Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cell: Inhibition by AMP-Activated Protein Kinase Activation, *Diabetes* 51(1):159-67.
- Jin, S.; Kang, P.M. (2024). A Systematic Review on Advances in Management of Oxidative Stress-Associated Cardiovascular Diseases, *Antioxidant (Basel)* 13(8), 923.
- Kang, H.; Ma, X.; Liu, J.; Fan, Y.; Deng, X. (2017). High glucose-Induced Endothelial Progenitor Cell Dysfunction, *Diab Vasc Dis Res* 14(5), 381-394.
- Kolluru, G.K.; Bir, S.C.; Kevil, C.G. (2012). Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling and Wound Healing, *Int J Vasc Med* 2012:918267.
- Lin, S.H.; Zhang, W.J.; Jiang, X.Q. (2019). Applications of Bioactive Ions in Bone Regeneration, *Chin J Dent Res* 22(2), 93-104.
- Madonna, R.; Balistreri, C.R.; Geng, Y.J.; De Caterina, R. (2017). Diabetic Microangiopathy: Pathogenetic Insights and Novel Therapeutic Approaches, *Vascul Pharmacol* 90, 1-7.
- Milatovic, D.; Yin, Z.; Gupta, R.C.; Sidoryk, M.; Albrecht, J.; Aschner, J.L.; Aschner, M. (2007). Manganese Induces Oxidative Impairment In Cultured Rat Astrocytes, *Toxicol Sci* 98(1), 198-205.
- Moriya, J.; Ferrara, N. (2014). Inhibiting the Response to VEGF in Diabetes. *Sci Signal* 7(307):pe1.
- Mouriño, V.; Cattallini, J.P.; Boccaccini, A.R. (2012). Metallic ions as therapeutic Agents in Tissue Engineering Scaffolds: An Overview of their Biological Applications and Strategies for new Developments, *J R Soc Interface* 9, 401-419.
- Okonkwo, U.A.; DiPietro, L.A. (2017). Diabetes and Wound Angiogenesis, *Int J mol Sci* 18(7), 1419.
- Oliveira Volpe, C.M.; Villar-Delfino, P.H.; Ferreira Dos Anjos, P.M.; Nogueira-Machado, J.A. (2018). Cellular Death, Reactive Oxygen Species (ROS) and Diabetic Complications, *Cell Death Dis* 9(2), 119.
- O'Neal, S.L.; Zheng, W. (2015). Manganese Toxicity Upon Overexposure: A Decade in Review, *Curr Environ Health Rep* 2(3), 325-28.
- Pantulap, U.; Arango-Ospina, M.; Boccaccini, A.R. (2021). Bioactive Glasses Incorporating Less-Common Ions to Improve Biological and Physical Properties, *J Mater Sci Mater Med* 33(1):3.
- Peres, T.V.; Pedro, D.Z.; de Cardova, F.M.; Lopes, M.W.; Goncalves, F.M.; Mendes de Aguiar, C.B.; Walz, R.; Farina, M.; Aschner, M.; Leal, R.B. (2013) In Vitro Manganese Exposure Disrupts

- MAPK Signaling Pathway in Striatal and Hippocampal Slices from Immature Rats. *Biomed Res int* 2013:769295.
- Perez-Araluce, M.; Jungst, T.; Sanmartin, C.; Prosper, F.; Plano, D.; Mazo, M.M. (2024). Biomaterials-Based Antioxidant Strategies for the Treatment of Oxidative Stress Diseases, *Biomimetics (Basel)* 9(1), 23.
- Sena, C.M.; Leandro, A.; Azul, L.; Seica, L.; Perry, G. (2018). Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches, *Front Physiol* 9: 1668.
- Sayed, S.; Faruq, O.; Preya, U.H.; Kim, J.T. (2023). Cathepsin S Knockdown Suppresses Endothelial Inflammation, Angiogenesis, and Complement Protein Activity Under Hyperglycemic Conditions In Vitro by Inhibiting NF- $\kappa$ B Signaling, *Int J Mol Sci* 24(6), 5428.
- Thomson, S.E.; McLennan, S.V.; Twigg, S.M. (2006). Growth Factors in Diabetes Complications. *Expert Rev Clin Immunol* 2(3):403-18.
- Wang, K.; Ge, Y.; Yang, Y.; Li, Z.; Liu, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y.; Pang, X., Ngan, A.H.W.; Tang, B. (2024). Vascular Endothelial Cellular Mechanics Under Hyperglycemia and Its Role in Tissue Regeneration, *Regen Biomater* 11, rbae004.
- Wang, S.; Zheng, B.; Zhao, H.; Li, H.; Zhang, X.; Wen, J. (2021). Downregulation of lncRNA MIR181A2HG by High Glucose Impairs Vascular Endothelial Cell Proliferation and Migration Through the Dysregulation of miRNAs/AKT2 Axis, *Int J Mol Med* 47(4), 35.
- Westhauser, F.; Wilkesmann, S.; Nawaz, Q.; Schmitz, S.I.; Moghaddam, A.; Boccaccini, A.R. (2020). Osteogenic Properties of Manganese Doped Mesoporous Bioactive Glass nanoparticles. *J Biomed Mater Res Part A*, 2020; 108:1806–15.
- Zhang, Y.; Liu, T.; Chen, Y., Dong, Z.; Zhang, J.; Sun, Y.; Jin, B.; Gao, F., Guo, S.; Zhuang, R. (2016). CD226 Reduces Endothelial Cell Glucose Uptake Under Hyperglycemic Conditions with Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus. *Oncotarget* 7(11):12010-23.