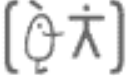




VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

 Facultat de
Medicina i Odontologia

Departamento de Fisiología

**Estudio de los mecanismos de estrés oxidativo, activación del
inflammasoma NLRP3 y las interacciones leucocito-endotelio en la
Diabetes: efectos del papel de la Empagliflozina**

TESIS DOCTORAL

Programa de doctorado en Fisiología

Presentada por:

Francesca Iannantuoni

Dirigida por:

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Dra. Milagros Rocha Barajas

Valencia, Enero 2021

Programa de Doctorado 3127. Doctorado en Fisiología (RD 99/2011).
Facultad de Medicina y Odontología.
Departamento de Fisiología.
Universitat de València

Doctoranda

Francesca Iannantuoni

Licenciada en Biología Sanitaria
Università degli studi di Siena

Directores

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Investigador en FISABIO - Profesor Asociado en la Universitat de Valencia
Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dra. Milagros Rocha Barajas

Investigadora Miguel Servet en FISABIO
Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Con la colaboración de:

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomedicina de la
Comunidad Valenciana (FISABIO)

Publicado en Valencia, 2021.

Dr. Víctor Manuel Víctor González, Investigador en la Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, y Profesor Asociado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

Dra. Milagros Rocha Barajas, Investigadora Miguel Servet en la Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia,

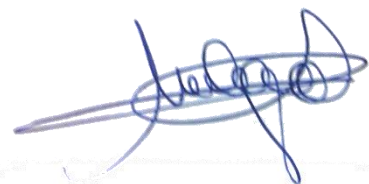
CERTIFICAN:

Que Dña. Francesca Iannantuoni, Licenciada en Biología Sanitaria por la Università degli studi di Siena, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Estudio de los mecanismos de estrés oxidativo, activación del complejo del inflammasoma NLRP3 y la interacción leucocito-endotelio en la diabetes: Efectos del papel de la Empagliflozina” y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Fisiología por la Universitat de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 9 de Enero de 2021.



Dr. Víctor Manuel Víctor González



Dra. Milagros Rocha Barajas

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el grupo de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset, perteneciente a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomedicina de la Comunidad Valenciana (FISABIO). Esta Tesis Doctoral ha sido también realizada gracias a las financiaciones de las siguientes instituciones:

“Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), de la Convocatoria de Ayudas de la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)”, referencias PI13/01025; PI16/01083; PI16/00301; PI18/00932, PI19/0838, PI19/00437; CIBERehd CB06/04/0071. “Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO)”, referencia UGP-15-220. “Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO)”, referencia PTA2017-14355I. “Conselleria de Educación, Cultura y Deporte – Generalitat Valenciana”, referencia PROMETEO/2019/027. Ayudas cofinanciadas con fondos FEDER “Una manera de hacer Europa” y Menarini S.A.

Francesca Iannantuoni ha disfrutado de una Ayuda Predoctoral “Santiago Grisolia” de la Conselleria de la Educación, Cultura y Deporte con referencia GRISOLIAP/2016/015; una Ayuda de Movilidad para personal investigador predoctoral de la Conselleria de Educación, Investigación, Cultura y Deporte “Subvenciones para estancias de contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunidad Valenciana – BEFPIE”, con referencia BEFPI/2018/030 para la realización de una estancia predoctoral de 7 meses en el laboratorio de investigación "Apoptosis, Cancer and Immunity", INSERM U1138, Gustave Roussy Comprehensive Cancer Center / Faculté de Médecine de Paris Descartes, Paris, France, liderado por el Dr. Guido Kroemer.

Para la creación de las figuras contenidas en esta memoria se han utilizado los recursos de Servier Medical ART (SMART).

“Logic will get you from A to B. Imagination will take you everywhere”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Aquí va el duro trabajo de los agradecimientos, que muchas veces es más duro que la entera escritura de la tesis! Una tesis la escribes y ya está, tardas pero antes o después encuentras las palabras mejores para describir los conceptos, con las personas pero no funciona así...no es fácil describir o agradecer alguien (y, por cierto, no olvidar a nadie!!!). Muchas veces las palabras hacen falta. Seguramente hay errores en estas páginas, pero quiero dejarlas así, para que sean más veras!

En primer lugar quiero empezar con agradecer mis directores por su apoyo profesional y humano. Al Dr. Víctor Manuel Víctor González por aceptarme en su grupo, por haber confiado en mí, gracias a su empeño, esfuerzo y dedicación personal que ha dedicado a este proyecto, a mi tesis y sobre todo a la corrección/interpretación de mi gramática! A la Dra. Milagros Rocha Barajas para las clases de estadísticas, y para haberme ayudado mucho sobre todo en el tramo final de esta tesis, aunque cuando este día me parecía muy lejano. Gracias a ambos por todo.

A mis compañeras del laboratorio de Endocrinología, mis amigas, mi familia aquí en València, a todas las que siguen allí y a la que se han ido (hoy todas lejos, pero siempre cerca de mi corazón). Rosa, mi mama española. Fuiste una de las primeras que conocí en el laboratorio junto con Celia. Aunque no te acuerde de esta época donde yo no hablaba nada de español y mi mejor amigo era un pequeño diccionario amarillo, yo sí que me recuerdo estos días lejanos en que te preguntaba cómo se llamaba en español cada cosa, apuntando todo en una libreta e intentando a aprender un idioma desconocido. Mira ahora donde he llegado gracias también a ti! Gracias por todo lo que enseñaste, por los consejos y por ser la mama de todas y de cuidarnos siempre! Celia, mi compañera de viaje, sé que ya te lo han dicho todas (y no es mi culpa ser la última de esta ronda de tesis), pero gracias por escucharme y darme buenos consejos siempre, por la calma e la paciencias que trasmites, casi mejor del yoga!! Espero regresar pronto para poder volver a pasear y a ir a la playa, mientras...que sepas que aquí hay aeropuerto! Arantxa, por estar siempre dispuesta a ayudar y a confrontarnos con los resultados y en las ideas. Hemos compartido amistad, dudas y pacientes!

A dues persones vaig a donar-li les gràcies en valencià: a Sandreta per haverme ensenyat que no tots els problemes són els meus problemes, sinó que existeixen els problemes de la Fency d'avui i els de la Fency de demà, i que hi ha sempre que pensar positiu. La teua energia i el teu afecte no tenen iguals, superen fins i tot els rebuts de quan anem de compres juntes! A Zaida, “mi pecorina”, el meu "IP and corresponding", la teua senzillesa i alegria contagien més que un refredat! He d'agrair als altres que no van estar al laboratori per circumstàncies de la vida, sinó probablement mai hauria tingut l'oportunitat de descobrir la persona meravellosa que ets. L'afecte i l'atenció que poses en tot els que fas és únic, gràcies.

Por último pero no ultimas...Susana, mi muer de las respuestas, para no haber nunca perdido la paciencia de contestar a mis miles preguntas. Muchas gracias por el apoyo y la paciencia en ayudarme siempre y los consejos de sabio, no hay bastante palabras por esto. Noelia y Feliz, vuestra mochilla os agradece por el cuidado que habéis tenido!!! Gracia a ambos por haber animado no solo a mí en los momentos tristes, sino mi vida! Habéis sido dos personas maravillosas, nunca olvidaré los días juntos, las risas y los viajes, espero veros pronto! A Carmen, un huracán de vida y de alegría! Eres un ejemplo de fuerza y de que nunca hay que rendirse en la vida.

Gracias también a los recién llegados en esta familia, Teresa, Pancho y Pedro, por los momentos (aunque pocos) vividos juntos. Gracias también a los compañeros de Oftalmología (Óscar, Silvia, Vicente y M^a Dolores), por la disponibilidad que habéis siempre tenido conmigo. Por último, quiero dar las gracias al Dr. Hernández y todos los miembros del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Dr. Peset.

En fin, a las personas más importantes, a los pacientes del servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Dr. Peset, sin los cuales no hubiera sido posible realizar los trabaos de mi tesis!! Gracias a todos y cada uno de los participantes de estos estudios para haber donado su sangre a la ciencia, no es tan fácil como parece reclutar a gentes. Gracias porque así la ciencia puede seguir descubriendo.

A la rubia que seguramente estará pensando que me he olvidado de ella....Non mi sono dimenticata!! Alla mia coinquilina, mi nena Roberta. Sin dal giorno in cui sei entrata ho avuto dubbi sul fatto che fossi del nord, sei una vera terrona mancata! Abbiamo condiviso tantissime cose che non basterebbero tutte le risme di fogli del mondo per elencarle! Abbiamo condiviso di tutto dalle risate alle lacrime, passando attraverso un "muro sottile" fino ad arrivare alla feste, ai bottellon, alle fiere del vino, agli scleri nostri e del vicino, alla "frzzol" e allo sfratto delle coinquiline.

Sei una delle persona che mi mancano di più, il mio punto di riferiferimento in terra straniera, senza di te non avrei mai girato i videotutorial di cucina! Spero tu abbia imparato a fare sto benedetto tiramisù, sennò te lo rispiego! Sei una persona fantastica e unica, ti auguro di trovare la forza di brillare sempre, te quiero compì!

Alla mia famiglia, Grande Capo, Made e Ciaca Ciaca, perchè anche se non lo ammettono, so che anche se la casa è meno rumorosa senza me, gli manco e mi vorrebbero li... ma tranquilli che non torno!!!

A Pellegrino, eh si, ci sei anche tu! A prescindere da come andrà, questo traguardo lo stiamo raggiungendo in due, *cin cin* a noi!

Esperando de no haber olvidado a nadie...gracias a todas por todos los momentos que hemos pasado juntas, buenos y malos, las alegrías y las tristezas, la amistad y sobretodo porque cada día aprendo algo nuevo con vosotras! Hay para no cansarse nunca y escribir mil de libros! Y sobre todo gracias por quererme así como soy y ser siempre dispuestas en escucharme y ayudarme siempre, gracias a vosotras se pueden contar en una mano las veces que echado de menos mi querida Italia.

Gracias a todos por haberme acompañado en este pequeño y maravilloso viaje llamado doctorado.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABSTRACT.....	1
REGULATION AND STRUCTURE.....	13
1. RESUMEN GLOBAL.....	17
1.1 Definición de diabetes mellitus (DM).....	19
1.2 Aspectos epidemiológicos y socioeconómicos.....	20
1.3 Fisiopatología de la diabetes tipo 1.....	21
1.4 Fisiopatología de la diabetes tipo 2.....	26
1.5 Complicaciones y comorbilidades asociadas a la diabetes.....	29
1.5.1 Sobrepeso y obesidad.....	29
1.5.2 Homeostasis de la glucosa y sus alteraciones.....	29
1.5.3 Ruta de señalización de la insulina.....	31
1.6 Complicaciones cardiovasculares.....	34
1.6.1 El proceso inflamatorio.....	35
1.6.2 Disfunción endotelial.....	38
1.6.3 Proceso aterosclerótico.....	39
1.6.3 Dinámica de la interacción entre células endoteliales y leucocitos....	41
1.7 Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la diabetes.....	43
1.7.1 El estrés oxidativo.....	43
1.7.2 La mitocondria.....	44
1.7.3 Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	47
1.7.4 Defensas antioxidantes.....	50
1.7.5 El inflamasoma NLRP3.....	52

1.7.5.1 Activación canónica, no-canónica y alternativa del inflamasoma	
NLRP3.....	53
1.5.5.2 Relación entre el inflamasoma NLRP3 y el sistema inmune.....	56
1.8 Manejo clínico de la diabetes y tratamiento.....	57
1.8.1 El riñón: un silencioso actor en la homeostasis de la glucosa.....	58
1.8.2 iSGLT2: La Empagliflozina como tratamiento terapéutico en la	
DM2.....	59
OBJETIVOS.....	63
PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	85
ANEXO I. PUBLICACIONES.....	113
Does glycemic control modulate the impairment of NLRP3 inflammasome activation in type 2 diabetes?	
The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates the inflammatory profile in type 2 diabetic patients and promotes an antioxidant response in leukocytes.	
Mitochondrial alterations and enhanced human leukocyte/endothelial cell interactions in type 1 diabetes.	
ANEXO II. PUBLICACIONES.....	151
Otras publicaciones con autoría durante el desarrollo de la tesis doctoral.....	153

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Patogénesis de la DM1.....	23
Figura 2. Esquema de la historia natural de la DM1.....	24
Figura 3. Mecanismos asociados a la IR.....	28
Figure 4. Homeostasis de la glucosa.....	30
Figura 5. Patogénesis del proceso aterosclerótico.....	41
Figura 6. Mecanismos moleculares en la cascada de adhesión leucocitaria.....	42
Figura 7. Cadena de transporte de los electrones y producción de radicales libres.....	45
Figura 8. Estructura y funcionamiento del inflammasoma NLRP3.....	53
Figura 9. Rutas de activación del inflammasoma NLRP3.....	55
Figura 10. Mecanismo de acción de los iSGLT2.....	60
Tabla 1. Clasificación etiopatológica de la DM.....	20
Tabla 2. Receptores de la glucosa que interviene en la reabsorción, transporte y regulación en la homeostasis de la glucosa.....	31

ABREVIATURAS

A_{1c}	hemoglobina glicosilada A _{1c} / glycated haemoglobin A _{1c}
ADA	Asociación Americana de Diabetes / American Diabetes Association
ADP	adenosín difosfato / adenosine diphosphate
AGEs	productos avanzados de glicosilación / advanced glycation end products)
APC	células presentadoras del antígeno / antigen presenting cell
ARE	elemento de respuesta antioxidante / antioxidant responsive element
ASC	proteína adaptadora asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de la caspasa / apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain
ATP	adenosín trifosfato / adenosine triphosphate
BMI	índice de masa corporal / body mass index
CAM	moléculas de adhesión celular / cellular adhesion molecules
CHD	enfermedad coronaria / coronary heart disease
CAT	catalasa / catalase
CNS	sistema nervioso central / central nervous system
CoA	coenzima A / coenzyme A
CRP	proteína C reactiva / C-reactive protein
CVDs	enfermedades cardiovasculares / cardiovascular disease
DAMP	patrones moleculares asociados a daño / damage associated molecular patterns
DAPIN	patrones asociados en apoptosis y respuesta a interferón / domain in apoptosis and interferon response
DC	células dendríticas / dendritic cell
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus tipo 1 / type 1 diabetes
DM2	diabetes mellitus tipo 2 / type 2 diabetes
DPP4	dipeptidil peptidasa 4 / dipeptidyl peptidase 4

E-selectina	selectina endotelial / endotelial selectin
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial / endotelial nitric oxide synthase
ERK	proteína quinasa de señal extracelular / extracellular signal-regulated kinase
FFAs	ácidos grasos libres / free fatty acids
FPG	niveles plasmáticos de glucosa / fasting plasma glucose level
GABA	ácido γ -aminobutírico / γ -aminobutyric acid
GAD-65	anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa / antibodies to glutamic acid decarboxylase
GAPDH	enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa / glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLP-1	hormona péptido similar al glucagón-1 / glucagon-like peptide 1
GLUT	transportadores de la glucosa / inglés glucose transportator
GPX	glutación peroxidasa / glutathione peroxidase
GSH	glutación / glutathione
GSK3	glucógeno sintasa 3 / glycogen synthase kinase 3
GSR	glutación S reductasa / glutathione S reductase
GSSG	glutación disulfuro / glutathione disulfide
HLA	antígeno leucocitario humano / human leukocyte antigen
HOMA-IR	índice de resistencia a la insulina / homeostatic model assessment - insulin resistance
HUVEC	células endoteliales humanas procedentes de vena de cordón umbilical / human umbilical vein endothelial cells
IA2	anticuerpos anti-tirosinafosfatasa 2 / antibodies to protein tyrosine phosphatase 2
IAA	anticuerpos anti-insulina / insulin autoantibodies
ICA	anticuerpos anti-islotos/antibody against cytoplasmic proteins in the beta cell
ICAM-1	molécula de adhesión intracelular-1 / intercellular adhesion molecule-1
IFN1	interferón de tipo 1 / type I interferons
IFN-γ	interferón-gamma / interferón gamma
I$\kappa$$\kappa$	kinasa del inhibidor κ B / inhibitory κ B kinase

IL	interleuquina / interleukin
IR	insulino-resistencia / insulin resistance
IRS	sustratos del receptor de la insulina / insulin receptor substrates
iSGLT2	inhibidores de la proteína SGLT2 / SGLT2 inhibitor
JNK	quinasa c-JUN NH2-terminal / c-JUN N-terminal kinases
KEAP1	proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch / Kelch-like ECH-associating protein 1
L-selectina	selectina de los leucocitos / leukocyte selectine
LADA	diabetes autoinmune latente de los adultos / latent autoimmune diabetes in adults
LDL	lipoproteínas de baja densidad / low-density lipoprotein (cholesterol)
LPS	lipopolisacáridos / lipopolysaccharides
LRR	secuencia repetitiva rica en leucinas / leucine-rich repeats domain
MAPK	proteín quinasa de activación mitogénica / mitogen-activated protein kinases
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad / major compatibility complex
MnSOD	manganeso superóxido dismutasa / manganese superoxide dismutase
MPO	mieloperoxidasa / myeloperoxidase
mt$\Delta\psi$	potencial de membrana mitocondrial / mitochondrial membrane potential
mtDNA	DNA mitocondrial / mitochondrial DNA
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero / mammalian target of rapamycin
NACHT	dominio central de unión y oligomerización de nucleótidos / nucleotide binding and oligomerization domain
NF-κB	Factor nuclear κ B / nuclear factor κ B
NK	natural killer
NLRP3	receptor dominio de oligomerización de nucleótidos-similar de tipo 3 / NOD-like receptor pyrin domain
NO	óxido nítrico / nitric oxide
NOD	dominio de oligomerización / nucleotide-binding oligomerization domain
NOS2	óxido nítrico sintasa 2 / oxide nitric synthase 2
NOX	NADPH oxidasa /NADPH oxidase

Nrf2	factor de transcripción NF-E2 / transcription factor NF-E2
O-GlcNAc	O-β-N-acetilglucosamina / O- β-N-acetylglucosamine
OAD	antidiabéticos orales empleados en la DM / oral anti-diabetic drugs
OGTT	test de tolerancia oral a la glucosa / oral glucose tolerance test
P-selectina	selectina de las plaquetas / platelet selectin
PAAD	dinucleótido de nicotinamida y adenina / pyridine aldehyde adenine dinucleotide
PAMAP	patrones moleculares asociados a patógenos / pathogen associated molecular patterns
PDE3B	fosfodiesterasa 3B /phosphodiesterase 3B
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas / platelet derived growth factor
PECAM	molécula de adhesión plaqueto-endotelial / platelet endothelial cell adhesion molecule
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa / phosphoinositide 3-kinase
PIP2	fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato / phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato / phosphatidylinositol (3,5)-trisphosphate
PKB / Akt	proteína quinasa B /protein kinase B
PKC	proteína quinasa C / protein kinase C
PMNs	leucocitos polimorfonucleares / polymorphonuclear leukocyte
PRR	receptores de reconocimiento de patrones / pattern recognition receptor
PYRIN	dominio de pirina / pyrin domain
RAGE	Receptor de los AGEs / receptor of AGEs
RNS	especies reactivas del nitrógeno /reactive nitrogen species
ROS	especies reactivas de oxígeno / reactive oxygen species
SAT	tejido adiposo subcutáneo / subcutaneous adipose tissue
SGLT	co-transportadores sodio-glucosa / sodium-glucose cotrans-porter
SIRT	sirtuína / sirtuin
SOD	superóxido dismutasa / superoxide dismutase
TGF-β	factor de crecimiento transformador-β / transforming growth factor-β

TLR	receptores tipo toll / toll-like receptor
TNF-α	factor de necrosis tumoral- α / tumor necrosis factor- α
UCP2	proteína desacoplante mitocondrial-2 / mitochondrial uncoupling protein-2
UPR^{mt}	ruta mitocondrial de las proteínas mal plegadas / mitochondrial unfolded protein response
VAT	tejido adiposo visceral / visceral adipose tissue
VCAM-1	molécula de adhesión vascular-1 / vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial / vascular endothelial growth factor
VLDL-c	lipoproteínas de muy baja densidad / very low-density lipoprotein (cholesterol)
WHO	Organización Mundial de la Salud / World Health Organization
ZnT8	anticuerpos anti-transportador 8 de zinc / antibodies to zinc transporter 8
XO / XAO	xantina oxidasa / xanthine oxidase

ABSTRACT

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders that occur when hyperglycaemia is sustained over a prolonged period of time due to a lack of pancreatic β -cell function and insulin production and release. These diseases are associated with several complications, including a modification in the metabolism of carbohydrates and lipids. As a consequence, diabetic patients usually suffer from hyperglycaemia, dyslipidemia, hypertension, chronic low-grade inflammation, atherosclerosis, chronic kidney disease, nerve damage, diabetic retinopathy, and/or cognitive impairment.

There are different types of DM, but type 1 (T1D) and type 2 (T2D) are the most common. T1D, also called "insulin-dependent diabetes mellitus" or "juvenile diabetes", is characterized by an autoimmune response that leads to a loss of pancreas β -cells and their failure to produce enough insulin. T2D, also known as "non-insulin-dependent diabetes mellitus" or "adult-onset diabetes", begins with impaired insulin signaling (insulin resistance) due to a combination of different factors, including a genetic component that predisposes individuals to the disease, excessive body weight, sedentary lifestyle, insufficient exercise and ageing.

Hyperglycaemia is a common feature of both T1D and T2D and is also a key factor in the development of DM that is associated in general with macro- and microvascular complications. In this sense, an adequate glycaemic control is essential for preventing the onset of these complications. With this aim in mind, a new class of oral antidiabetic drugs called SGLT2 inhibitors (iSGLT2) is currently taking its place as an option for the first-line management of DM. iSGLT2's mechanism of action is based on the inhibition of the sodium-glucose co-transporter 2 expressed in the brush border membrane of the epithelial cells of the renal proximal tubule;

following this interaction, renal reabsorption of glucose is reduced and urinary excretion of glucose is increased (glycosuria and natriuresis). For this reason, iSGLT2 shows potential as an adjunct therapy to increase the lowering of glucose levels when used in combination with other glucose-lowering therapies (e.g. insulin, metformin). In addition, iSGLT2 treatment has been shown to improve cardiovascular outcomes and reduce the risk of hospitalization for heart failure, while the progression of diabetic kidney disease is significantly reduced by all iSGLT2s. In this context, we decided to investigate the mechanism of action of iSGLT2s, choosing Empagliflozin as one of the most widely-used drugs in this family.

Mitochondria are widely known as “powerhouses of the cell”, as they take part in cell metabolism, ATP production through oxidative phosphorylation, and reactive oxygen species (ROS) production. Due to their key role, homeostasis of the mitochondria is important to prevent the onset and progress of metabolic diseases such as DM. In this sense, T2D is characterized by impaired mitochondrial function, oxidative stress, and increased ROS production, together with undermined antioxidant defences.

Systemic inflammation is one of the main features of DM, and is characterized by enhanced circulatory levels of proinflammatory cytokines and chronic activation of the immune system due to the autoimmune response (in T1D) and hyperglycaemia (in T2D), which are involved in vascular damage and atherosclerosis, a first step towards DM-associated complications. In the vascular wall, endothelial cell damage induces the release of cytokines and the expression of adhesion molecules (such as ICAM-1, VCAM-1 and selectins). This triggers the process of recruitment of activated leukocytes towards the vascular endothelium, where leukocytes contribute to endothelial dysfunction by promoting oxidative stress, releasing inflammation

mediators, and initiating the atherosclerotic process. In this context, it is necessary to find the relationship between inflammation and leukocyte-endothelium interactions. Since leukocytes play an important role in oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation in both T1D and T2D, it is important to study the underlying mechanisms of these cardiovascular diseases in the cell.

In the scientific literature, the role of hyperglycaemia in the development of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation and vascular complications is well described. Moreover, glucose levels and their alteration can modulate the inflammatory response, which has made them a target of study. Under hyperglycaemia, leukocyte-endothelial interactions can be affected by DM, and this can have a bearing on the development of the atherosclerotic process.

Objectives

In the present doctoral thesis we established three objectives:

1. To assess the relationship between the inflammatory/adhesive process in the vascular wall and intracellular mechanisms in type 1 diabetic patients, and to explore its relevance for ROS production and mitochondrial impairment.
2. To explore the role played by glycaemic control in NLRP3 inflammasome activation in type 2 diabetic patients.
3. In the light of the beneficial effects of treatment with the iSGLT2 Empagliflozin on the glycaemic state and vasculature of T2D patients, we set out to determine whether Empagliflozin ameliorates systemic inflammation and to evaluate its potential antioxidant properties in leukocytes in the peripheral blood of type 2 diabetic patients.

Methods

T1D and T2D patients and healthy volunteers underwent a physical examination to determine anthropometric parameters (weight, height, waist and hip circumference and blood pressure), and blood samples were obtained from the antecubital vein in fasting conditions for biochemical assessments. Parameters of glucose, glycated haemoglobin A_{1c}, HOMA-IR index, and lipid profile (total cholesterol, LDL-c, HDL-c and triglycerides, and inflammation markers (CRP) were assessed in serum using laboratory methods.

In order to shed some light on our first goal, we assessed the concentration of myeloperoxidase (MPO), proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and selectins) in serum samples from type 1 diabetic patients, which were stored at -80°C. MPO concentration was determined by an ELISA immunoassay, whereas cytokines and adhesion molecules were measured using a Luminex® 200 flow analyzer and XMAP technology (Luminex Corporation).

Total mitochondrial ROS production and mitochondrial membrane potential were evaluated by static fluorimetry using a fluorescence microscope (IX81; Olympus, Hamburg, Germany) coupled with ScanR static cytometry software (Olympus, Hamburg, Germany). To perform this assay, 1.5×10^5 of fresh isolated PMNs were seeded per well in 48-well plates and incubated with the following fluorescent probes: 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, to visualize total ROS production), red mitochondrial superoxide indicator (MitoSOX, to visualize mitochondrial ROS production) and tetramethylrhodaminemethylester (TMRM, to visualize membrane potential).

Leukocyte-endothelium interaction assays were carried out using a parallel plate flow chamber system, which is an *ex vivo* model of human physiological conditions, and an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S; Amstelveen, Netherlands). The leukocyte suspension was drawn across a monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) at a physiological flow rate. Real-time microscope videos (Sony Exware HAD; Koeln, Germany) were recorded and later analyzed to calculate leukocyte rolling velocity, flux and adhesion.

Total RNA were extracted from isolated peripheral leukocytes, and levels of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were subsequently evaluated by RT-qPCR.

Employing the methods described above, we explored our second objective by studying biochemical and anthropometrics parameters, as well as total and mitochondrial ROS content, in type 2 diabetic patients and healthy volunteers. To do this, the T2D group was split into two subgroups according to HbA_{1C} levels: HbA_{1C} ≤7; and HbA_{1C} ≥8. Patients with HbA_{1C} levels between 7 and 8 were excluded from the analysis to avoid a “grey zone” due to variability of the results.

Total RNA and protein were extracted and levels of NLRP3 inflammasome (mRNA and protein), caspase-1 (mRNA), interleukin (IL)-1β (mRNA and serum expression), IL-18 (mRNA) and IL-12 (serum expression) were subsequently evaluated by RT-qPCR, Western blotting and Luminex assays.

Finally, for our third objective, we recruited a group of T2D patients who initiated treatment with 10 mg/day of empagliflozin, according to standard clinical care. We studied anthropometric and biochemical indicators, as well as MPO and IL-10 levels,

in type 2 diabetic subjects. Measurements were taken at baseline and at 12 and 24 weeks.

Mitochondrial ROS content was studied as described above, and glutathione (GSH) content was evaluated by means of CellTracker™ Green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA). Antioxidant defences were assessed by measuring glutathione S-reductase (GSR), and catalase (CAT) gene expression was evaluated by an RT-qPCR method.

The statistics software programmes SPSS 17.0 and Graphpad Prism 5.0 were employed for data analysis in all three studies.

Results and discussion

T1D patients did not show impaired glucose homeostasis, and a reduction in total and LDL-c levels was observed, probably due to the insulin and lipid-lowering treatment they were receiving. Regarding total and mitochondrial ROS levels and mitochondrial membrane potential, we observed that all parameters were higher in T1D patients than in control subjects. In line with this, several studies support the idea that hyperglycaemia can promote pathological alterations of ROS in endothelial cells and mitochondrial function. Altered levels of ROS, in turn, can affect mitochondrial membrane potential. Accordingly, when we observed the dynamics between isolated PMNs and endothelial cells we found a decrease in PMN rolling velocity and an increase in PMN rolling flux and adhesion in T1D patients compared with controls. In line with these results, we noticed an increase in levels of the adhesion molecules P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 in type 1 diabetic patients, together with an imbalance in antioxidant gene expression; specifically, a decrease in

SOD expression and a trend towards an increase in CAT gene expression levels. In addition, the inflammation markers TNF- α , IL-6 and MPO were all enhanced in the T1D group. Together, these data highlight how the inflammatory process that occurs in T1D can eventually lead to atherosclerosis and CVDs.

Lastly, we explored a possible correlation between glucose and HbA_{1C} levels. We found a negative correlation with glucose and rolling velocity and a positive correlation with cellular adhesion to ICAM-1 and VCAM-1. In addition, HbA_{1C} was negatively correlated with rolling velocity, and positively correlated with rolling flux, cellular adhesion, ICAM-1, VCAM-1 and TNF α . TNF α was positively correlated with mitochondrial membrane potential, rolling flux and MPO. Total ROS production was negatively correlated with rolling velocity, and VCAM-1 was positively correlated with IL-6, while MPO positively correlated with hs-CRP, highlighting the proinflammatory process associated with T1D.

Regarding our second objective, we found significant differences in weight, waist circumference and body mass index (BMI), all of which were increased in our T2D subjects. In addition, levels of fasting glucose, HbA_{1C}, insulin, and HOMA-IR index were enhanced in the same patients. Lipid profile was altered (lower levels of total cholesterol, HDL-c and LDL-c than in healthy volunteers, and enhanced levels of triglycerides), a typical feature of atherogenic dyslipidemia. This may be explained by the antihyperlipidemic treatment which most of our diabetic patients were receiving. When the two T2D groups were compared, no differences in lipid profile were observed, while levels of fasting glucose, HbA_{1C} and insulin and HOMA-IR index were higher in the group with poor glycaemic control. Interestingly, hs-CRP

was higher among T2D with poor glycaemic control than in controls, in consonance with the low-grade chronic systemic inflammation that is typical in T2D.

In terms of ROS production, leukocytes from both T2D groups were evaluated according to HbA_{1C} levels (HbA_{1C} ≤7; HbA_{1C} ≥8). As expected, enhanced levels of total and mitochondrial ROS production were detected in both T2D groups with respect to volunteers. When the two T2D groups were compared, we observed a more pronounced increase in mitochondrial ROS in the HbA_{1C} ≥ 8 group with respect to both the HbA_{1C} ≤ 7 group and controls, probably due to differing glycaemic control status. This suggests that the loss of glycaemic control in these patients is related with an imbalance of mitochondrial dynamics in their leukocytes, which impairs mitochondrial function.

When we explored NLRP3 inflammasome mRNA and protein expression levels, the data revealed a decrease in both mRNA and protein expression levels in both T2D groups with respect to controls, and was more pronounced in T2D patients with poor glycaemic control, thus suggesting a considerable impairment of the inflammatory response in leukocytes from these patients.

When cytokine levels were evaluated, a decrease in IL-1β was observed (measured by mRNA expression and in serum levels), in line with low-grade chronic inflammation. When we analysed the two diabetic subgroups, we observed that mRNA expression levels were specifically reduced in HbA_{1C} ≥ 8% diabetic patients, while serum IL-1β levels were significantly lower in both groups with respect to controls, with a more pronounced drop seen in patients with poor glycaemic control. The data related to IL-12 revealed a decrease in serum levels in T2D patients, especially in poorly controlled patients. When we evaluated mRNA expression levels of caspase-1, a decrease was found in the T2D group with respect to controls. When

the T2D group was split into two, significant values were maintained only in the poorly controlled one. Furthermore, IL-18 mRNA expression showed a trend towards lower values, without becoming significant. Together, these data lead us to believe there is a severe dysregulation of the immune response in T2D, and that glycaemic control is essential for the adequate immune response of leukocytes in T2D.

Lastly, we performed correlation studies in order to evaluate the role of glycaemic control during T2D on NLRP3 inflammasome activation. We explored potential correlations between HbA_{1C} and inflammasome activation-related factors, observing negative correlations between HbA_{1C} levels and NLRP3 protein expression, production of caspase-1, IL-1 β and IL-12.

In order to address our third objective, we evaluated the effects of iSGLT2 Empagliflozin treatment on oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from T2D patients and their respective controls. We detected a significant decrease in weight after 12 weeks of Empagliflozin treatment, which became even more pronounced at 24 weeks of treatment and was accompanied by a reduction of waist circumference. As expected, when we assessed biochemical parameters, glucose levels were found to have decreased during Empagliflozin treatment, becoming significant at 24 weeks, a trend that was also reflected in HbA_{1C} levels. Moreover, we observed no changes in HOMA-IR index and insulin levels after Empagliflozin treatment-patients whose treatment included insulin were excluded from HOMA-IR and insulin assessments-. Otherwise, lipid profile analysis revealed an increase in total cholesterol and triglyceride levels at 12 weeks of treatment, and a decrease at 24 weeks of treatment. These results, together with our other data, suggest that Empagliflozin treatment improves metabolic outcomes in T2D.

When mitochondrial superoxide production was analysed in leukocytes, we observed a trend towards less production of mitochondrial superoxide, which became statistically significant after 24 weeks; on the other hand, GSH content had increased significantly after 12 weeks of treatment, and even more so after 24 weeks. Data regarding the mRNA expression of GSR and CAT showed an increase in GSR from 12 weeks onwards, becoming more significant at 24 weeks. In contrast, CAT expression became significant only after 24 weeks of treatment, underlying the antioxidant effect of empagliflozin treatment in T2D.

Analysis of hs-CRP, IL-10 and MPO data revealed a significant decrease in all these markers after 24 weeks of treatment, thus confirming that the main effects of Empagliflozin on metabolism and oxidative stress start to become evident after this period of treatment. This suggests that Empagliflozin has a protective role in the vascular wall, and may prevent oxidative damage and the onset of CVDs.

Overall, the findings of the current doctoral thesis reveal that mitochondrial dysfunction, oxidative stress and glycaemic control affect leukocyte dynamics and function in both T1D and T2D patients by promoting the interaction between these cells and the vascular endothelium and therefore vessels damage due to low grade inflammation. Moreover, our data support the hypothesis that treatment of T2D patients with Empagliflozin ameliorates the disease's inflammatory profile. Together, these findings suggest that adequate management of the glycaemic state and inflammation and the use of iSGLT2 can prevent the onset of the atherosclerotic process and, consequently, delay the development of DM-associated vascular complications.

REGULATIONS AND STRUCTURE

According to the regulations approved by the Doctoral School and the Academic Committee of the PhD Programme in Physiology of the University of Valencia:

1. The present PhD thesis has been structured in the form of a **compendium of publications**:

- The core of the thesis is composed of three original first-author (or co-first-author) papers published in Q1 journals according to the Journal Citation Reports database (Annex I: Publicaciones).

2. Based on the present PhD thesis Ms. Francesca Iannantuoni would like to apply for the **International Doctorate Mention**:

- The thesis includes an **abstract** in English consisting of an introductory chapter explaining the consistency in the theme of the papers, a chapter containing the main results and discussion, and a chapter setting out the general conclusions.
- During the training period the PhD candidate has spent seven months in a prestigious research center outside Spain (Institute Gustave Roussy Cancer Center/Cordeliers Research Center, Paris).
- The thesis has been written in Spanish, except for the abstract and conclusion, which are in English, and it will be defended in Spanish, except for the conclusion, which will be defended in English.

1. RESUMEN GLOBAL

1.1 Definición de diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas heterogéneas caracterizadas por un estado de hiperglucemia secundaria a un defecto absoluto o relativo en la secreción de insulina por parte de las células- β del páncreas. Dicha enfermedad se asocia a alteraciones en el metabolismo glucídico, lipídico y proteico. Bajo esta condición, los sujetos afectados por esta enfermedad pueden desarrollar enfermedades secundarias como dislipidemia, obesidad y enfermedades cardiovasculares (macro- y micro-vasculares) que pueden afectar a diferentes órganos y tejidos (vasos sanguíneos, corazón, ojos, nervios y riñón). Además de estas acciones, los pacientes con DM presentan también una condición de inflamación sistémica crónica de bajo grado. Es de destacar que existen distintas formas de esta enfermedad, entre ellas la diabetes tipo 1 (DM1) y la diabetes tipo 2 (DM2).

Para realizar la diagnosis de DM, el parámetro más utilizado como medida objetiva del estado glucémico es la hemoglobina glicosilada A_{1C} . La hemoglobina contenida en los glóbulos rojos bajo una condición de hiperglucemia plasmática puede reaccionar de manera no enzimática con la glucosa, glicosilándose y dando lugar a la hemoglobina glicosilada (A1c) (Nathan et al., 2007). La A1c, por lo tanto, es uno de los marcadores claves empleados para estudiar no solo el estado glucémico sino también para evaluar la eficacia del tratamiento de la DM. Además, la A_{1C} nos permite evaluar las variaciones en los niveles de glucosa durante un periodo de 2-3 meses (Nathan et al., 2007; Weykamp, 2013) teniendo en cuenta que la vida media de los glóbulos rojos es de 120 días. Este valor se expresa como el porcentaje de la hemoglobina adulta que se glicosila. Utilizando este valor podemos identificar diferentes estadios de la enfermedad como por ejemplo el estado de pre-diabetes, es decir el posible riesgo de desarrollar la DM2; en el estado de pre-diabetes, los niveles de A_{1C} están entre 5,7 y 6,4%, mientras, en la DM2 son $\geq 6,5\%$. Mientras que la DM1 se diagnostica por la presencia de autoanticuerpos, para completar el panel diagnóstico de la DM2, la Asociación Americana de la Diabetes (ADA, del inglés American Diabetes Association) apuntó que había otras tres condiciones asociadas con la DM2: niveles plasmáticos de glucosa en ayunas (fasting plasma glucose level, FPG) ≥ 126 mg/dL tras 8 horas de ayuno; glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL a las 2 horas en la prueba de tolerancia oral a la glucosa (oral glucose

tolerance test, OGTT); y niveles aleatorios de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dL en sujetos con síntomas de hiperglicemia.

Los criterios de clasificación de los estados de pre-diabetes (A_{1C} entre 5,7 y 6,4%) y de la DM ($A_{1C} \geq 6,5\%$) se definieron por la ADA en el 1997. En la misma guía, se trazaba además la clasificación de los distintos subtipos de DM que se sigue utilizando hoy en día (Genuth et al., 2003). La clasificación divide las formas de DM en 4 clases, según su etiopatogénesis (American Diabetes Association, 2013).

Tabla 1. Clasificación etiopatológica de la DM.

Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)	Afecta más frecuentemente a población joven y se caracteriza por una producción deficiente de insulina.
Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)	Afecta más frecuentemente a población adulta y se caracteriza por una ineficaz acción de la insulina.
Diabetes gestacional	Afecta las mujeres embarazadas no diabéticas. Se manifiesta con niveles de glucosa en la sangre aumentados durante el embarazo y que, generalmente, vuelven a los niveles normales después del parto.
Otros tipos de diabetes	Defectos genéticos de la función de las células- β del páncreas o en la acción de la insulina, formas autoinmunes, secundarias a enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, tratamientos farmacológicos, enfermedades infecciosas.

1.2 Aspectos epidemiológicos y socioeconómicos

La DM afecta a más de 366 millones de personas en el mundo, y es una de las enfermedades con más prevalencia a nivel mundial, no obstante, hay muchos casos no diagnosticados. Se estima que en 2015 fallecieron 1,6 millones de personas por causa de la hiperglucemia debida a la diabetes y unos 2,2 millones de personas en 2012 (“WHO,” 2019). Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés World Health Organization) la diabetes será la séptima

causa de mortalidad en 2030 (“WHO,” 2019) y uno de cada 10 adultos estará afectado por ésta. Además, la diabetes tiene una prevalencia más alta en los países en desarrollo económico (Wild et al., 2004), muy probablemente debido a los cambios de hábitos de vida. Para prevenir la DM y sus consecuencias, es muy importante seguir un estilo de vida saludable, con una dieta equilibrada, y actividad física regular para prevenir la obesidad, así como evitar el consumo de tabaco y alcohol. Otro factor muy importante es la prevención mediante controles periódicos en los sujetos de riesgo (obesos y/o sujetos con historia familiar de DM).

1.3 Fisiopatología de la diabetes tipo 1

La DM1, también llamada diabetes insulino dependiente o juvenil, es una enfermedad que se manifiesta sobretodo en edad pediátrica y, rara vez, en edad adulta (Maahs et al., 2010). La DM1 puede ser considerada como una enfermedad inflamatoria de los islotes pancreáticos en la cual los linfocitos T activados y las citoquinas inflamatorias interactúan entre ellos dando lugar en último término a apoptosis de las células pancreáticas (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001). Además, la ausencia de insulina que caracteriza la DM1 es secundaria a la destrucción de las células- β del páncreas y, por lo tanto, los sujetos afectados necesitan la administración diaria de esta hormona. La DM1 representa el 10-15% de los casos totales de DM (Kharroubi and Darwish, 2015). Entre sus síntomas característicos destacan la sed (polidipsia) junto con excreción excesiva de orina (poliuria), ingesta constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales, cansancio y, más importante, el riesgo de sufrir estados de cetoacidosis.

En la clasificación actual, la DM1 se subdivide en dos subtipos: DM1-A o tipo LADA (del inglés latent autoimmune diabetes in adults, diabetes autoinmune latente de los adultos), forma autoinmune secundaria a la destrucción de las células- β del páncreas y DM1-B o forma idiopática en la cual hay ausencia de autoinmunidad y de componente genético predisponente (Alberti and Zimmet, 1998; Bach, 1994).

En la historia natural de la DM1-A el componente genómico que se correlaciona mayoritariamente con el riesgo de desarrollar la enfermedad son los genes

asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II, del inglés major compatibility complex II), específicamente los que codifican por el antígeno leucocitario humano (HLA, del inglés human leukocyte antigen). Estos genes son los principales reguladores de la presentación antigénica bajo la condición de la respuesta inmune adaptativa. Los genes HLA asociados a un mayor riesgo de DM1 son los genes HLA de clase II, específicamente HLA-DQA y HLA-DQB (Caputo et al., 2005; Noble and Valdes, 2011; Urcelay et al., 2005).

Además, se han encontrado asociaciones con más de 50 regiones cromosómicas y genes no-HLA que afectan al riesgo genético de DM1, y éstos son genes que intervienen en la regulación de la tolerancia inmunológica, en los mecanismos de defensa de las células pancreáticas, en la producción de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores, confirmando el carácter poligénico de esta enfermedad. A este componente genético, se suma otra circunstancia desencadenante que promueve el desarrollo de la respuesta autoinmune que, por un lado, conlleva una activación de los linfocitos T, los cuales destruyen de forma selectiva las células- β pancreáticas y, por otro, promueve el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico (Eizirik et al., 2009). En esta secuencia de hechos, las principales células que intervienen son los linfocitos T (CD4+ y CD8+) y B, los macrófagos, las células dendríticas (DC, del inglés dendritic cell) y las células natural killer (NK). Todos estos tipos celulares liberan distintos mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , del inglés tumor necrosis factor- α), el interferón- γ (IFN- γ) que pueden inducir la secreción de óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide) por parte de las células- β , promoviendo la apoptosis (Cnop et al., 2005) y el reclutamiento de las células presentadoras del antígeno (APC, del inglés antigen presenting cell). A su vez, las células apoptóticas pueden también inducir una respuesta inflamatoria, instaurándose de esta manera un círculo vicioso que contribuye a reforzar e incrementar el daño a los islotes pancreáticos.

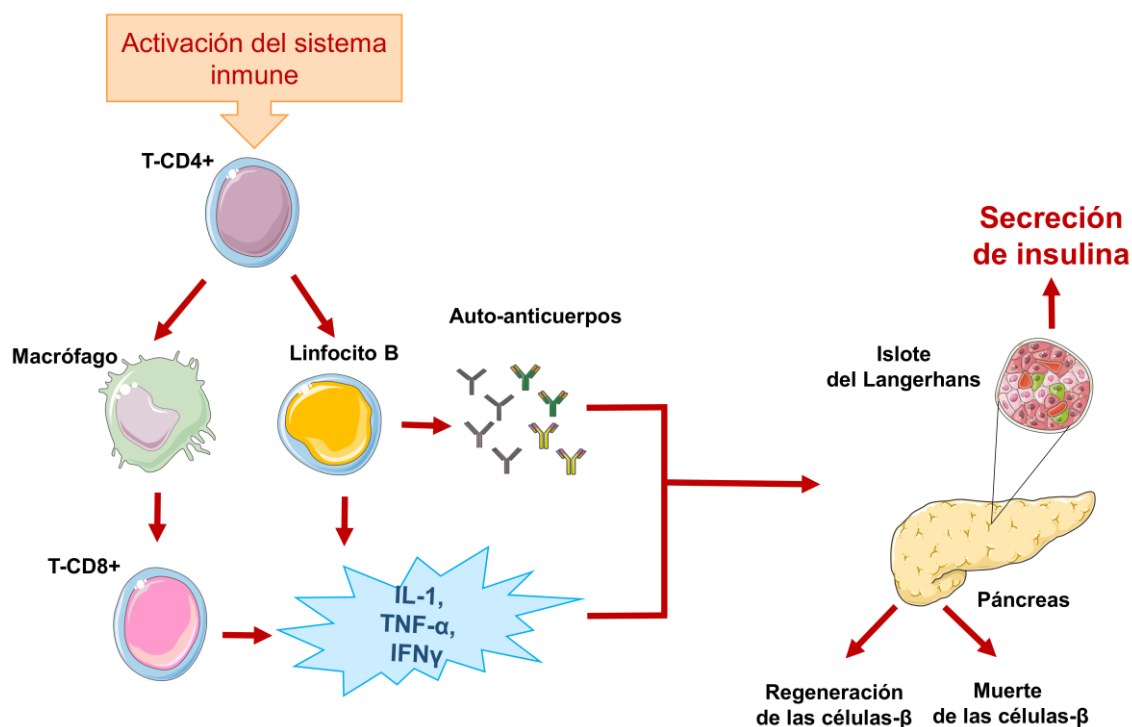


Figura 1. Patogénesis de la DM1. En respuesta a un estímulo externo (ej. bacteria), el sistema inmunitario que se encontraba en fase quiescente, se activa. En este momento junto a la respuesta inmune fisiológica mediada por las células T CD4+, las células T CD8+ y los macrófagos, los linfocitos B producen los autoanticuerpos dirigidos contra las células-β pancreáticas. En este contexto, la liberación de mediadores de la inflamación hace que la respuesta inflamatoria se prolongue y se refuerce, aumentando el daño celular.

La destrucción de las células-β ocurre de manera progresiva, de forma más rápida en los niños, y más lenta en los adultos. Esta condición se manifiesta de forma asintomática (fase prodrómica), hasta cuando la masa de células-β disminuye hacia un valor crítico y el paciente empieza a presentar la sintomatología característica, necesitando un tratamiento con insulina exógena (Atkinson et al., 2014; Christoffersson et al., 2016) (Figura 2). Se ha descrito que desde que empieza la respuesta autoinmune hasta la aparición clínica de la DM1 pueden pasar hasta 10 años dado que los islotes de Langerhans ocupan alrededor del 1% del peso del páncreas, y que cada islote contiene de media 1.000 células (Christoffersson et al., 2016).

Historia natural de la Diabetes tipo1

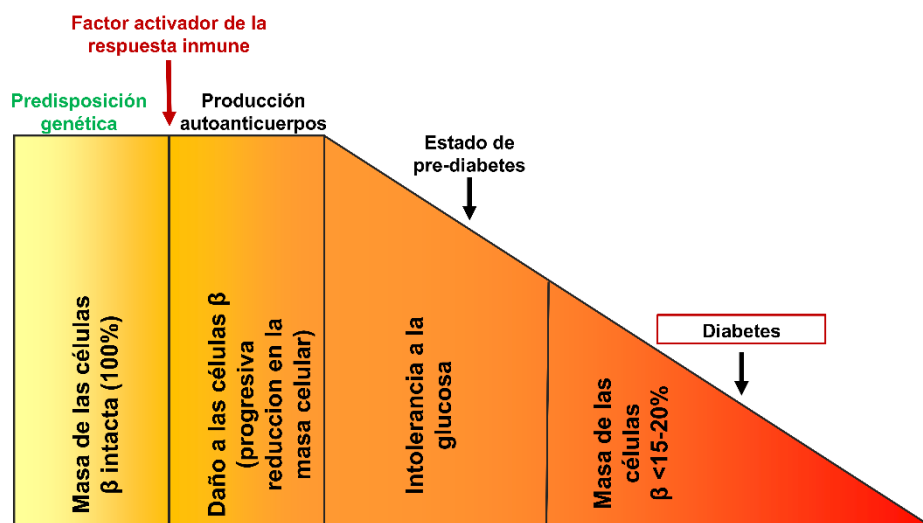


Figura 2. Esquema de la historia natural de la DM. En un primer período preclínico de duración variable, los sujetos con una predisposición genética permanecen asintomáticos. Tras la estimulación por un agente externo (ej. Virus tipo Coxsackie, fragmentos de proteínas de la leche de vaca, etc), se instaura una respuesta inmune anómala, dentro de la cual se producen anticuerpos contra las células propias del organismo (aparición de los anticuerpos anti-ICA, anti-GAD65, anti-IAA). Estos anticuerpos causan una destrucción en las células-β pancreáticas, dando lugar a una pérdida en la masa del órgano. Cuando la masa de células productoras de insulina alcanza un valor crítico, el paciente presenta la sintomatología clásica generada por la insulinopenia y la hiperglucemia.

Hasta la fecha, se ha demostrado que los autoanticuerpos contra los antígenos pancreáticos pueden ser detectados en el suero de pacientes DM1 y, por lo tanto, pueden ser empleados como marcadores de actividad de enfermedad y de diagnóstico diferencial de la DM1-A (Bingley, 2010). Los autoanticuerpos presentes son:

- Anticuerpos anti-islotos (ICA, del inglés against cytoplasmic proteins in the beta cell) fue el primer marcador descrito. Son un grupo de anticuerpos de clase IgG dirigidos contra los antígenos insulares. Se encuentra en el 65-90% de los pacientes DM1 y se asocia a un fenotipo clínico intermedio. En general, los sujetos con estos tipos de anticuerpos muestran una secreción menor de péptido C. También este anticuerpo está presente en la DM2 (al Sakkaf et al., 1992; Maclaren et al., 1999).

- Anticuerpos anti-insulina (IAA del inglés insulin autoantibodies). Estos anticuerpos se encuentran en sujetos bajo tratamiento con insulina exógena. Son anticuerpos dirigidos a un epítipo conformacional de la insulina, concretamente contra la leucina en posición 13 de la cadena alfa y, por lo tanto, es un marcador específico de autoinmunidad contra las células- β del páncreas. Estos anticuerpos están correlacionados directamente con la velocidad de desarrollo de la enfermedad y negativamente con la edad (Fineberg et al., 1991).
- Anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa-65 (GAD-65, del inglés antibodies to glutamic acid decarboxylase): este enzima lleva a cabo la descarboxilación del glutamato para producir el ácido γ -aminobutírico (GABA, del inglés γ -aminobutyric acid), un importante neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central (CNS, del inglés central nervous system) y periférico. Este anticuerpo está presente también en la DM2 (Maclaren et al., 1999).
- Anticuerpos anti-tirosinafosfatasa (anti-IA2, del inglés antibodies to protein tyrosine phosphatase). Este enzima está expresado sobre todo en las células neuroendocrinas de los islotes pancreáticos y del CNS, aunque su papel no está totalmente demostrado, está implicado en la regulación de la secreción de la insulina y en la selección negativa de la inmunidad (Lampasona and Liberati, 2016; Maclaren et al., 1999).
- Anticuerpos anti-transportador de zinc (anti-ZnT8, del inglés antibodies to zinc transporter 8): este antígeno se encuentra mayoritariamente presente en las células- β y es la diana principal para la respuesta humoral y celular en humanos. Estos anticuerpos aparecen en la fase preclínica, justo después de los anticuerpos IAA y GAD, y son predictivos de una rápida evolución de la DM1 (Wenzlau et al., 2010).

Por último, en la etapa que precede a la aparición de los síntomas clínicos (como por ej. poliuria o bajada de peso), la ausencia de insulina se refleja a nivel analítico en la disminución de niveles del péptido C en el plasma. A la vez, esta fuerte conexión con el sistema inmunitario hace que estos sujetos estén más predispuestos a desarrollar otras enfermedades autoinmunes como por ej. tiroiditis de Hashimoto o de Graves-Basedow, enfermedad de Addison, celiaquía, vitíligo, anemia perniciosa, miastenia gravis y hepatitis autoinmune (de Graaff et al., 2007).

1.4 Fisiopatología de la diabetes tipo 2

La DM2, también llamada diabetes no insulino dependiente o diabetes de la edad adulta, tiene una prevalencia más alta en los adultos (a partir de los 45 años de edad), aunque están aumentando los casos en niños afectados por dicha enfermedad (“WHO,” 2019). A diferencia de la DM1, puesto que carece de componente autoinmune, se caracteriza por una producción insuficiente de la insulina y/o uso metabólico ineficiente por parte de las células de los tejidos debido a una situación de insulino-resistencia (IR, del inglés insulin resistance) periférica no compensada. De esta forma, los sujetos afectados no siempre necesitan insulina como tratamiento.

Aunque la DM2 puede clasificarse como una enfermedad inflamatoria (Donath and Shoelson, 2011), está estrictamente asociada a la obesidad, de hecho la mayoría de estos pacientes presentan un índice de masa corporal (BMI del inglés body mass index) mayor a 30 kg/m^2 (punto de corte para la obesidad de grado I). La asociación entre estas dos enfermedades se debe a la presencia de tejido adiposo visceral, que a su vez está correlacionada con una mayor IR. Otros factores de riesgo de desarrollar la DM2 es el haber sufrido diabetes gestacional, una condición de hipertensión o dislipidemia, etnia, historia familiar de DM y, la presencia de un componente genético predisponente (“WHO,” 2019).

Esta forma de DM tiene un diagnóstico difícil y muchas veces tardío. La condición de hiperglucemia se desarrolla de forma gradual, resultando, por tanto,

asintomática al principio; esto hace que este estado de pre-diabetes sea diagnosticado en la mayoría de los casos por casualidad durante controles de rutina. El diagnóstico precoz de la DM es de vital importancia porque se ha demostrado que se puede retrasar el desarrollo de esta enfermedad aportando cambios al estilo de vida, como una dieta más saludable y la práctica de ejercicio físico (Balducci et al., 2006; Barnard et al., 1992).

A nivel molecular, como se explicará en detalle más adelante en esta tesis, la IR es consecuencia de defectos en el receptor de la insulina (reducción en el número, alteraciones estructurales, defectos en la afinidad de unión del receptor o defectos en la transmisión de la señal) (Shepherd et al., 1998); por otro lado, a nivel fisiológico, la IR se manifiesta cuando las células dianas pierden la capacidad de responder correctamente a la acción hipoglucemiante de la insulina. Este hecho se refleja en la reducción de la captación de glucosa por parte de tejidos periféricos como tejido adiposo, músculo e hígado (Carnagarin et al., 2015). En los adipocitos del tejido adiposo, la insulina inhibe la lipólisis mediante la lipasa sensible a las hormonas y la estimulación de la lipasa favoreciendo la lipogénesis; en los sujetos con IR este mecanismo está comprometido y por tanto se refleja en una alteración de la lipólisis, tanto en ayunas como postprandial con el consiguiente aumento de los ácidos grasos libres (FFAs, del inglés free fatty acids) en el torrente sanguíneo. El aumento de los FFA liberados, se acumulan a nivel del hígado (acumulación ectópica de lípidos), activando las rutas de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática, y estimulando la síntesis hepática de triglicéridos, aumentando de esta manera la hiperlipidemia (Carnagarin et al., 2015); por otro lado, los FFAs activados se unen con la coenzima A (CoA, del inglés coenzyme A) y pueden o ser almacenados o bien oxidados por la mitocondria (Coelho et al., 2013). A nivel muscular, la IR impide la utilización de la glucosa mediante la inhibición de la piruvato deshidrogenasa, enzima clave de la glicólisis, favoreciendo la instauración de un estado de hiperglicemia crónica (Coelho et al., 2013) (Figura 3). La glucosa no captada por los órganos se va acumulando en el torrente sanguíneo hasta poder alcanzar y superar los límites fisiológicos, produciéndose de esta manera, la hiperglicemia (DeFronzo, 2004).

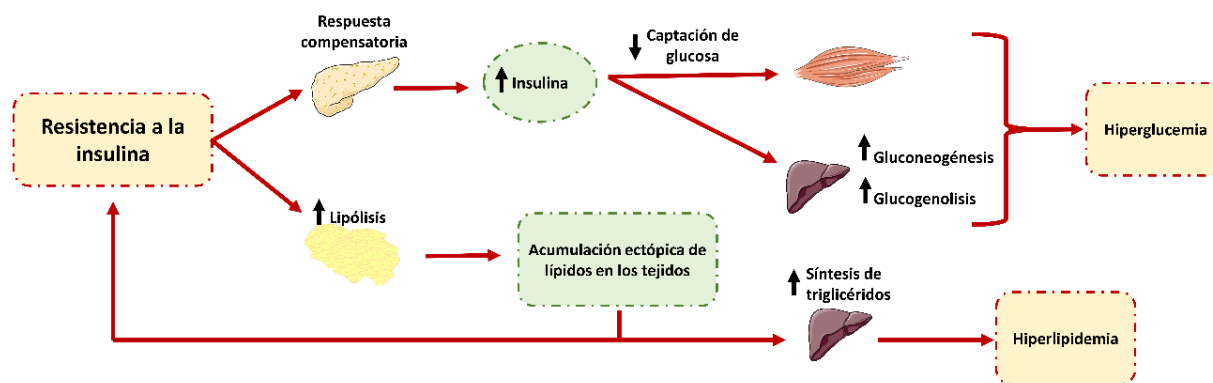


Figura 3: Mecanismos asociados a la IR. A consecuencia de los fallos en la señalización de la insulina, el páncreas instaura una respuesta compensatoria aumentando la producción de la misma. El aumento de la IR, por un lado, en los tejidos periféricos, provoca un aumento de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis, aumentando los niveles de glucosa, y por otro lado, en el tejido adiposo se estimula la lipólisis con la consecuente liberación de ácidos grasos, acumulación ectópica de lípidos en los tejidos, fomentando la resistencia a la insulina y a la vez instaurando un estado de hiperlipidemia.

Para poder evaluar el estado de IR de un paciente, los clínicos se sirven del índice de evaluación de resistencia a la insulina con el modelo homeostático (HOMA-IR, del inglés homeostatic model assessment - insulin resistance) que se calcula a partir de los valores de glucosa e insulina en ayunas siguiendo la fórmula (Matthews et al., 1985):

$$\text{HOMA} = (\text{Glucosa (mg/dL)} \times \text{Insulina (mg/dL)}) / 405$$

La hiperglicemia y la falta de respuesta sistémica a la insulina pueden ser detectadas por las células- β pancreáticas como señales de escasez de insulina en los tejidos periféricos y, por lo tanto, deberían aumentar la producción y secreción de insulina (proceso de compensación de las células β). El resultado, por lo tanto, es un aumento de los niveles circulantes de insulina. Al igual que todos los órganos que pueden desarrollar respuestas compensatorias, también el páncreas va sufriendo si esta condición de “falta de insulina” y de mayor producción persiste en el tiempo. Por lo tanto, a largo plazo, se desarrolla una progresiva disfunción de las células- β acompañada por una gradual destrucción de las mismas por apoptosis. Este es uno de los puntos críticos para el desarrollo de la DM2. Además, es de destacar que en la DM2 se está produciendo un desequilibrio en la regulación de la homeostasis de la glucosa por parte del hígado y el músculo esquelético.

1.5 Complicaciones y comorbilidades asociadas a la diabetes

1.5.1 Sobrepeso y obesidad

Sobrepeso y obesidad son factores de riesgo para desarrollar no sólo la DM2 sino también la dislipidemia, hipertensión, enfermedades del sistema cardiovascular, problemas respiratorios, osteoartritis y algunos tipos de cánceres (Jensen et al., 2014). En los últimos años la prevalencia mundial de la obesidad ha aumentado alrededor del 27,5% en los adultos y de un 47,1% en los niños. La obesidad es una enfermedad multifactorial resultado de una compleja relación entre factores genéticos, socioeconómicos y culturales, o puede ser una complicación secundaria a tratamientos farmacológicos como por ejemplo sulfonilureas, tiazolidinedionas o la insulina que se utilizan para el tratamiento de la DM2 (Apovian, 2016; Apovian and Aronne, 2015). De hecho, un BMI ≥ 25 kg/m² o un perímetro de cintura (obesidad abdominal) ≥ 88 cm en mujeres y ≥ 102 cm en hombres, ya define un riesgo 4 veces mayor respecto a los sujetos con este valor inferior, independientemente de la presencia de otros factores de riesgo metabólicos, como la DM2 (Apovian, 2016; Gray et al., 2015; Hu et al., 2001; Lecube et al., 2017). Además, el estado inflamatorio subyacente a la obesidad favorece la infiltración de las células mediadoras de la inflamación en los islotes pancreáticos favoreciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y hormonas (que aumentan la inflamación crónica y la IR presente en la DM) (Hotamisligil et al., 1993; Izaola et al., 2015; Ouchi et al., 2011).

1.5.2 Homeostasis de la glucosa y sus alteraciones

La función principal de la homeostasis de la glucosa es garantizar a los tejidos y a las células de todo el cuerpo unos adecuados niveles de glucosa, tanto en condiciones de ayuno como a nivel postprandial. Este equilibrio se produce mediante la vía de la gluconeogénesis y de la glucogenolisis. Los principales órganos que requieren y utilizan la glucosa serían el intestino, cerebro, páncreas, hígado, tejidos muscular y adiposo. Cuando los nutrientes llegan al intestino estimulan las células L del íleon-colon a producir la hormona péptido similar al glucagón-1 (GLP-1 del inglés glucagon-like peptide 1) (Eissele et al., 1992). Éste

pasa al torrente sanguíneo y en los islotes de Langerhans regula el estímulo de la secreción de la insulina por parte de las células- β y del glucagón por parte de las células α regulando de esta manera la glucemia postprandial (Halden et al., 2016) (Figura 4).

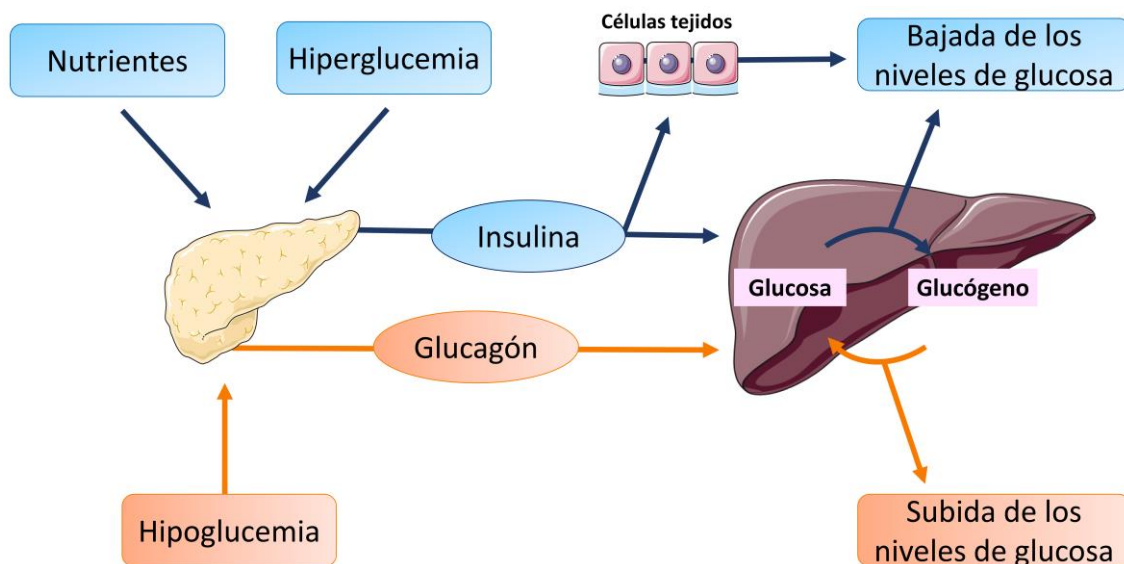


Figure 4. Homeostasis de la glucosa. Tras la ingestión de los alimentos se produce un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa. Para bajar estos niveles dentro de los rangos fisiológicos, el páncreas libera insulina a cargo de las células- β con el fin de promover la utilización de la glucosa por los tejidos periféricos. A la vez, la insulina interactúa con el hígado inhibiendo la gluconeogénesis, señal que por el contrario promueve la liberación de glucagón por parte de las células α de los islotes pancreáticos. Estas señales interactúan entre sí hasta lograr alcanzar unos valores de glucemia entre 70-110 mg/mL.

En el tejido muscular y adiposo, la insulina se une a sus correspondientes receptores permitiendo la captación y utilización de glucosa; a nivel hepático, la insulina inhibe la producción de glucosa y promueve gluconeogénesis, lipogénesis e incorporación de aminoácidos a las proteínas. Una vez pasada la fase postprandial, el cuerpo entra en una fase de ayuno y bajo estas condiciones, los niveles de glucosa en sangre van disminuyendo hasta alcanzar un umbral en el que las células α pancreáticas liberen glucagón promoviendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis en hígado, y aumentando la reabsorción de glucosa en el riñón (Alsahli and Gerich, 2017; Röder et al., 2016).

1.5.3 Ruta de señalización de la insulina

La ruta de señalización de la insulina es un proceso complejo y muy sensible a la interferencia por parte de distintos factores. En condiciones normales, tras la ingesta, los nutrientes como proteínas, vitaminas, ácidos grasos y la glucosa son absorbidos a nivel intestinal y transportados a la circulación. En el cuerpo humano el transporte de la glucosa entre los distintos órganos puede realizarse o según gradiente (difusión) o bien contra gradiente (transporte activo). Este último ocurre, por ejemplo, en el intestino y en el riñón mediante los transportadores de la glucosa (GLUT del inglés glucose transportator) y los co-transportadores sodio-glucosa (sodium-glucose cotransporter, SGLT) (Navale and Paranjape, 2016).

Los receptores GLUT están formados por 12 segmentos hidrofóbicos en forma de α -hélice dispuestos como un canal revestido por aminoácidos hidrófilos (Barrett et al., 1999; Navale and Paranjape, 2016). Existen varias isoformas, (GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4, GLUT-5), las cuales, aunque muy similares, tienen distintas propiedades y características en cuanto a cinética, distribución en los tejidos y función. Los receptores SGLT están ubicados en la membrana apical de los enterocitos (SGLT-1) y en el túbulo renal (SGLT-1 y 2), y permiten el transporte de una molécula de glucosa junto a dos iones de sodio (Na^+) (Navale and Paranjape, 2016). El Na^+ está más concentrado en el espacio extracelular respecto al citosol; el enlace con el Na^+ provoca una modificación conformacional que facilita el enlace de la glucosa y su transporte (Tabla 2).

TRASPORTADOR	LOCALIZACION	FUNCION
GLUT-1	Ubicuo	Absorción basal de glucosa, necesaria para la respiración celular.
GLUT-2	Hepatocitos, células β -pancreáticas, enterocitos, riñón	Permite la salida de glucosa desde las membranas basales de los enterocitos, la regulación de la liberación de insulina y la eliminación de la sobrecarga de glucosa de la sangre.
GLUT-3	Neuronas	Absorción basal de glucosa.

GLUT-4	Adipocitos, cardiomiocitos	Regula la absorción de la glucosa en respuesta a la insulina.
GLUT-5	Intestino delgado	Tiene mayor afinidad por la fructosa que por la glucosa.
SGLT-1	Intestino delgado, túbulo renal (segmentos s2 y s3)	Transporta 2 Na ⁺ y 1 molécula de glucosa
SGLT-2	Túbulo renal (segmento s1)	Transporta 1 Na ⁺ y 1 molécula de glucosa

Tabla 2. Receptores de la glucosa que interviene en la reabsorción, transporte y regulación en la homeostasis de la glucosa.

El transportador GLUT-2 es el primero que interviene en la ruta insulínica. Este transportador está involucrado en la absorción de la glucosa tras la ingestión de alimentos en el enterocito y en la captación de la glucosa por las células- β pancreáticas (Kalwat and Cobb, 2017). Estas células pueden secretar insulina de forma rápida y de manera constante según la necesidad de los órganos y de las fluctuaciones de la glucemia. El hígado es un órgano clave en el mantenimiento de la glucemia (Lei et al., 2018; Matschinsky, 1990). En respuesta a la insulina produce señales que promueven el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno mediante la glucogenogénesis y se inhibe la gluconeogénesis (Ramnanan et al., 2011). Sin embargo, cuando la glucemia se reduce por debajo de un umbral fisiológico, entra en juego otra hormona, el glucagón, antagonista de la insulina. Esta hormona está producida por las células- α del páncreas que en los hepatocitos aumenta la hidrólisis de glucógeno y favorece la gluconeogénesis (Doyle and Egan, 2007; Ramnanan et al., 2011).

En este sentido, el transportador de la glucosa más estudiado es el GLUT-4. En condiciones normales esta proteína está localizada en el citoplasma en forma de vesículas, y tras la unión con la insulina, se transloca a la membrana celular, favoreciendo el transporte de la glucosa desde el espacio intersticial al interior de la célula (Richter and Hargreaves, 2013). Cuando la concentración plasmática de la insulina se normaliza, GLUT-4 es internalizado por endocitosis mediante un

sistema de vesículas intracelulares. A nivel muscular esta translocación del GLUT-4 se favorece por la contracción muscular, el aumento del flujo sanguíneo y los bajos niveles de glucógeno que caracterizan el ejercicio físico de larga duración, explicando también por qué el practicar deporte ayuda a prevenir la IR en la DM2 (Kolb and Martin, 2017; Tully et al., 2016).

El receptor específico de la insulina es una proteína transmembrana heterotetramérica formada por dos subunidades alfa que captan a la insulina, y dos subunidades beta con actividad tirosin quinasa. Tras la unión con la insulina, se autofosforila y desarrolla un cambio conformacional dando lugar a su forma activa. El receptor activado está implicado en el reclutamiento de las proteínas señalizadoras como el sustrato del receptor de la insulina (IRS, del inglés insulin receptor substrates), la proteína quinasa B (PKB, del inglés protein kinase B conocida también como Akt), responsable de los efectos metabólicos de la insulina en los tejidos periféricos (captación de glucosa, síntesis de glucógeno, inhibición de la lipólisis) (Boucher et al., 2014), la proteína quinasa C (PKC, del inglés protein kinase C) y el fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés phosphoinositide 3-kinase). Este último cuando es fosforilado por el IRS, promueve la fosforilación de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2 del inglés phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3 del inglés phosphatidylinositol (3,5)-trisphosphate). El PIP3 promueve el enlace de la PKB a la membrana plasmática, donde se activa por fosforilación. Es de destacar que la PKB puede participar de distintas maneras en la ruta de la insulina. De hecho, está implicada en la translocación de GLUT-4 (Cho et al., 2010); mediante la glucógeno sintasa-3 (GSK3 del inglés glycogen synthase kinase-3) participa en la síntesis de glucógeno (Summers et al., 1999); contribuye a la actividad anti-lipolítica de la insulina mediante la fosforilación de la fosfodiesterasa-3B (PDE3B del inglés phosphodiesterase-3B) (Kitamura et al., 1999), y por último a través de la ruta mTORC1/p70S6K interviene sobre la síntesis de proteínas (Proud et al., 2001).

El receptor de la insulina puede estar regulado de forma negativa o bien por moléculas/ rutas que modulan y reducen su actividad mediante fosforilación/desfosforilación del mismo o en residuos de serina o treonina de las proteínas del IRS que le impiden la unión con su receptor (Greene et al., 2001), o

bien en respuesta a un aumento en los niveles de FFAs generados bajo estrés celular o por citoquinas proinflamatorias.

1.6 Complicaciones cardiovasculares

Las complicaciones más relevantes de la DM son las enfermedades cardiovasculares (CVDs, del inglés cardiovascular disease), entre ellas las enfermedades coronarias y la cardiopatía isquémica. La elevada concentración de glucosa plasmática mantenida en el tiempo provoca daño a las células endoteliales de los vasos sanguíneos promoviendo enfermedades que afectan los pequeños vasos (complicaciones microvasculares) a nivel ocular (retinopatía diabética), renal (nefropatía diabética) y neurológico (neuropatía diabética). Junto a los capilares, los vasos de gran calibre como las arterias (aorta, coronarias y femoral) también pueden estar afectados por la hiperglucemia, desarrollando complicaciones macrovasculares como la cardiopatía isquémica, enfermedades arteriales periféricas y cerebrovasculares (Hernandez-Mijares et al., 2013).

La relación entre glucemia y CVDs no ha sido descrita en detalle, y la mayoría de los datos que se disponen hoy en día provienen de estudios en cohortes muy heterogéneas de pacientes con DM2. En este sentido, se sabe muy poco del riesgo cardiovascular efectivo en la DM1. Lo que es cierto es que un buen control glucémico está correlacionado, en general, con un menor riesgo de desarrollar obesidad, hipercolesterolemia, hipertensión y eventos cardiovasculares (Haghighatpanah et al., 2018). Sin embargo, hay diferencias en la prevalencia de las enfermedades que afectan a uno u otro tipo de pacientes. En la DM1, las complicaciones más frecuentes son la enfermedad coronaria (CHD, del inglés coronary heart disease), eventos cerebrovasculares y la enfermedad arterial periférica, aunque se hayan encontrado también casos de infarto y cardiomiopatía isquémica (de Ferranti et al., 2014). En general, los eventos cardiovasculares son más frecuentes en los pacientes afectados por la DM1 y se desarrollan antes comparados con sujetos no diabéticos de la misma edad, y son más frecuentes en mujeres (de Ferranti et al., 2014). Además, es ≈ 10 veces más frecuente que en la población general ajustada por edad (Krolewski et al., 1987; Roger et al., 2012). La prevalencia de las CVDs descrita en la literatura depende de diferentes factores,

entre los cuales cabe destacar el tiempo de evolución de la DM1, la edad de los pacientes, así como el sexo y la etnia (Bhupathiraju and Hu, 2016; Hu et al., 2001, 2005; Juutilainen et al., 2004). Con respecto a este hecho, algunos estudios han descrito una relación entre la duración de la DM y las CVDs, observando que a partir de los 15 años de evolución de la enfermedad, el riesgo de enfermedad coronaria se iguala a la de un sujeto sin DM que tiene antecedentes por CVDs (Vaccaro et al., 2004; Wannamethee et al., 2004).

En la DM2, la literatura describe exhaustivamente las CVDs en esta cohorte de sujetos, describiendo la enfermedad cerebrovascular, la angina estable, la cardiopatía isquémica y el infarto de miocardio como las principales causas de mortalidad en estos pacientes. Con respecto a las enfermedades microvasculares, la nefropatía diabética es la principal causa de insuficiencia renal (Morrish et al., 2001).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de las CVDs junto a la hiperglucemia son:

- El tabaquismo, el cual contribuye al fomento de la inflamación crónica de bajo grado que se desarrolla en la DM.
- La obesidad, la cual puede activar de forma inapropiada el sistema renina-angiotensina (Boustany et al., 2004).
- La aterosclerosis, proceso que afecta la anatomía de los vasos y su hemodinámica. Se caracteriza por disfunción endotelial y aumento en la resistencia vascular periférica que puede provocar hipertensión (Pavlou et al., 2018) o incluso llevar a ruptura de los vasos (aneurisma). Además, está correlacionada con la deficiencia relativa de insulina en la DM1 (Dullaart, 1995) y con la IR en la DM2 (Choi and Ginsberg, 2011). En la DM1 y DM2 se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos, de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c, del inglés very low-density lipoprotein (colesterol)), de baja densidad (LDL-c, del inglés low-density lipoprotein (colesterol)) que además se presentan más pequeñas y densas y, por último, con una disminución de los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-c, del inglés high-density lipoprotein (colesterol)) (Choi and Ginsberg, 2011; Dullaart, 1995).

Sin duda, entender todos los procesos que subyacen a las CVDs, los factores moleculares y los tipos celulares involucrados (por ejemplo, células endoteliales y

los leucocitos de sangre periférica) sigue siendo uno de los desafíos más importantes de esta enfermedad, así como la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento.

1.6.1 El proceso inflamatorio

El sistema inmune juega un papel clave en la fisiopatología de la DM. Sin embargo, su papel puede ser muy diferente entre los distintos subtipos de DM; mientras que la DM1 se caracteriza por una disfunción del sistema inmune, el cual produce autoanticuerpos contra las células- β pancreáticas, en la DM2 la lipotoxicidad es el factor desencadenante (Surmi and Hasty, 2008), si bien, las células leucocitarias también juegan un papel importante en la inflamación sistémica crónica de bajo grado asociada a la IR (Donath and Shoelson, 2011; Kahn et al., 2006; Petersen and Shulman, 2006). De hecho, la fosforilación en residuos de serina de los IRS, provoca una inhibición en la señalización de la insulina. Bajo condiciones normales, esta fosforilación es llevada a cabo por la quinasa c-JUN NH₂-terminal (JNK, del inglés c-JUN N-terminal kinases) y el inhibidor de la subunidad β de la quinasa de NF- κ B ($I\kappa\kappa\beta$, del inglés inhibitor of nuclear factor κ B kinase β) (van Greevenbroek et al., 2013; Wellen and Hotamisligil, 2005). Este último, $I\kappa\kappa\beta$, al ser fosforilado induce la liberación de NF- κ B, que es translocado al núcleo y promueve la expresión de otros mediadores proinflamatorios, entre ellos la interleuquina-1 (IL, del inglés interleukin), IL-6, IL-12, y TNF α (Shoelson et al., 2006), y moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1 o CD106, del inglés vascular cell adhesion molecule-1), molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1 o CD54 del inglés intercellular adhesion molecule-1) y las selectinas (Ghosh et al., 1998).

En medicina, el proceso inflamatorio, está definido como una respuesta fisiológica o bien como un mecanismo de defensa inespecífica frente a las agresiones del medio generado por agentes inflamatorios, en un contexto caracterizado por la presencia de las células inflamatorias y de los mediadores de la misma. Independientemente del subtipo de DM, la respuesta inflamatoria se caracteriza por la presencia sistémica de mediadores liberados por los leucocitos polimorfonucleares (PMNs, del inglés polymorphonuclear monocytes) activados, adipocitos y hepatocitos, (Donath and Shoelson, 2011) como la citoquina

proinflamatoria IL-6 y el TNF α (Herder et al., 2005; Kristiansen and Mandrup-Poulsen, 2005). Ambos juegan un papel clave en la IR ya que pueden participar en la fosforilación de receptor IRS mediante la inhibición de I κ B β (238 Boucher, J. 2014), participan en las rutas de señalización de la PKC y, por último, intervienen en la modulación de la expresión del receptor GLUT4 disminuyendo su reclutamiento hacia la membrana celular (Leguisamo et al., 2012; Rotter et al., 2003). A la vez, la IL-6 promueve a nivel hepático y en los adipocitos la producción de la proteína C reactiva (CRP, del inglés C-reactive protein), una proteína inflamatoria de fase aguda, la cual une la fosforilcolina de las células bacterianas y/o dañadas activando la vía clásica del sistema del complemento. Además, está asociada al riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares como la CHD o la isquemia (Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2012).

En estas condiciones, existen otras citoquinas proinflamatorias que juegan un papel fundamental, como la IL-1 β y la IL-18. La IL-1 β aumenta bajo condiciones de hiperglucemia y promueve el deterioro de las células- β (Maedler et al., 2017). Dicha citoquina es secretada por las células del sistema inmune (entre ellas monocitos, macrófagos y células dendríticas) y tiene efectos proinflamatorios ya que promueven la vasodilatación, la producción de prostaglandinas y el reclutamiento de células inmunitarias. Además, la IL-1 β interviene en la señalización de la insulina (McGillicuddy et al., 2011) y en la adipogénesis (Lagathu et al., 2006). La IL-18 es también secretada por los macrófagos activados y las células dendríticas, y está involucrada en la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en linfocitos T_H1 y en la aterosclerosis. Además, hay estudios que correlacionan los niveles de IL-18 circulante con la IR (Ahmad et al., 2017; Bosch et al., 2005).

Sin embargo, TNF α , IL-6, IL-1 β e IL-18 afectan directamente a la IR tanto a nivel local como sistémico (Cai et al., 2005; Dinarello, 2009; Martinez-Hervas et al., 2015) y su presencia está asociada a un elevado riesgo de desarrollar enfermedades micro- y macrovasculares (Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2012; Lowe et al., 2014; Yudkin et al., 2000), mediante los procesos que se detallarán a continuación.

1.6.2 Disfunción endotelial

El endotelio vascular es un órgano muy complejo que secreta y libera una gran variedad de sustancias vasoactivas las cuales pueden actuar de forma autocrina, paracrina y/o endocrina. El endotelio está involucrado en el proceso de trombogénesis (produce sustancias que participan en la fibrinólisis), participa activamente en el proceso de inflamación de los vasos y, por último y no menos importante, regula el tono vascular y el flujo sanguíneo, los cuales permiten controlar la presión sanguínea. A tal fin, produce sustancias con capacidad vasoconstrictora correlacionada con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antitrombóticas como la endotelina 1 y la angiotensina II, y sustancias con actividad vasodilatadora, como el NO y la prostaciclina que están relacionadas con propiedades proinflamatorias, prooxidantes y protrombóticas (Hadi et al., 2005).

La disfunción endotelial ocurre cuando este delicado y complejo equilibrio entre vasodilatación y vasoconstricción, factores pro- y antioxidantes, antitrombóticos y antiinflamatorios se desequilibra, favoreciendo el desarrollo de un estado de estrés oxidativo e inflamación, con el consecuente daño vascular, infiltración leucocitaria, proliferación de las células endoteliales (Mikhed et al., 2015) y alteraciones en la dinámica del flujo sanguíneo que, finalmente, desembocan en patologías como la aterosclerosis y la trombosis (Carrizzo et al., 2018; Mikhed et al., 2015; Zhang et al., 2017). El daño endotelial puede dar lugar de forma precoz a enfermedades y/o malfuncionamiento de las rutas de señalización de los factores involucrados, como por ejemplo una disminución en la biodisponibilidad de NO por reducción de la producción de la NO sintasa endotelial (eNOS, del inglés endotelial nitric oxide synthase). En este sentido, el estrés oxidativo favorecido por la hiperglicemia a nivel del endotelio vascular puede jugar un papel principal en este desequilibrio (Apostolova et al., 2014).

En la DM, la hiperglicemia es uno de los mayores factores predisponentes a la disfunción endotelial y a las CVDs. La hiperglicemia, de hecho, promueve el estrés oxidativo, que veremos en detalle posteriormente. Bajo esta condición, se produce el radical superóxido (O_2^-) que, a nivel subendotelial, reacciona con el NO inhibiendo su función vasodilatadora y, en consecuencia, pudiendo desarrollar disfunción endotelial y CVDs. A su vez, la elevada concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) puede crear un foco

inflamatorio donde se liberan grandes cantidades de mediadores proinflamatorios y también de otras ROS, ampliando y activando un círculo vicioso inflamación-daño endotelial-apoptosis celular-producción de ROS que se retroalimenta (Cheng et al., 2011), como se explicará más adelante en detalle.

Considerando la importancia de la homeostasis del endotelio vascular en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares, es imprescindible y fundamental incluir un seguimiento continuo de los marcadores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión arterial, y el perfil lipídico, y poder de esta manera hacer una correcta monitorización del riesgo de CVDs y prevenir su posible desarrollo en estos pacientes.

1.6.3 Proceso aterosclerótico

Una de las causas más frecuente de la base de las CVDs, es la aterosclerosis. Se trata de un proceso generalmente irreversible, con modificación del endotelio vascular y que conlleva entre otras consecuencias, el endurecimiento de los vasos, los cuales pierden su elasticidad a causa de los depósitos de calcio, colesterol, restos celulares y tejidos cicatriciales que concurren al desarrollo de las placas de ateroma. En este entorno se desarrolla daño endotelial debido al acúmulo de material en el espacio subendotelial, y ralentización del flujo sanguíneo debido a una reducción del lumen vascular favoreciendo la formación de trombos. En la DM los principales factores desencadenantes son la inflamación junto a la dislipidemia, la IR, y la hiperglucemia. El resultado es la implantación de un estado de estrés oxidativo y de inflamación sistémica de bajo grado persistente que determinan la disfunción endotelial y, por lo tanto, aumenta el riesgo de CVDs (Kaur et al., 2018; Sánchez-Recalde A and Carlos Kaski, 2001; Shah and Brownlee, 2016).

Desde el punto de vista de los eventos que desarrollan el proceso aterogénico, este puede dividirse en cuatro etapas fundamentales (Figura 5):

1. Oxidación de las partículas de LDL-c plasmáticas en el subendotelio: la disfunción endotelial y las alteraciones estructurales que se crean en la pared de los vasos sanguíneos favorecen la migración y la acumulación anormal de moléculas de LDL-c en el espacio subendotelial. Bajo condiciones de estrés oxidativo, estas moléculas de LDL-c son oxidadas por las ROS, como el radical superóxido (O_2^-), el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^\cdot$), y distintas enzimas liberadas por las células del sistema inmune, como la mieloperoxidasa (MPO del inglés myeloperoxidase) y las lipooxigenasas (Weber and Noels, 2011). Además, se ha demostrado que en los pacientes diabéticos, las partículas de LDL-c son más pequeñas y densas que en los sujetos sanos y más susceptibles a la oxidación (Ivanova et al., 2017).

2. Activación de las células del endotelio vascular: una vez oxidadas, las LDL-c promueven la liberación de quimioquinas (con acción quimiotáctica) y la expresión de moléculas de adhesión de superficie por parte del endotelio (Drechsler et al., 2015). Las moléculas de adhesión y su papel serán descritas en detalle más adelante en esta tesis. Las principales células reclutadas en el proceso de activación del endotelio, son los leucocitos, fundamentalmente monocitos. Éstos tras la migración a la pared arterial se diferencian a macrófagos y comienzan a fagocitar LDL-c oxidadas llegando a convertirse en células espumosas, ya que presentan el citoplasma cargado de vesículas de contenido lipídico.

3. Exceso y acúmulo de lípidos en la pared vascular: al crecer la lesión a nivel vascular, se crea una condición de hipoxia y de falta de nutrientes que, junto con los niveles elevados de LDL-c, sobrepasan la capacidad de fagocitar de los macrófagos, pudiendo provocar la muerte de los mismos mediante la vía de la apoptosis y liberando su contenido intracelular en la pared del vaso. Este hecho hace que se active más la inflamación reclutando más monocitos e instaurando un círculo vicioso ya que a medida que la lesión aterosclerótica va evolucionando, el potencial inflamatorio aumenta. Las células espumosas junto a los linfocitos T que han migrado a la lesión forman la lesión aterosclerótica inicial, llamada también estría lipídica (Weber and Noels, 2011).

4. Proliferación y migración hacia la íntima de las células musculares lisas: las células endoteliales producen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF del inglés platelet derived growth factor) que estimula la proliferación de las células de músculo liso de la capa media del vaso y la producción de colágeno. Tras este evento la lesión está sometida a remodelamiento recibiendo el nombre de placa ateromatosa. La placa favorece, por un lado, el aumento de la resistencia al flujo sanguíneo y, por otro, la reducción del lumen vascular llevando a la oclusión del mismo (Badimon and Vilahur, 2014; Weber and Noels, 2011).

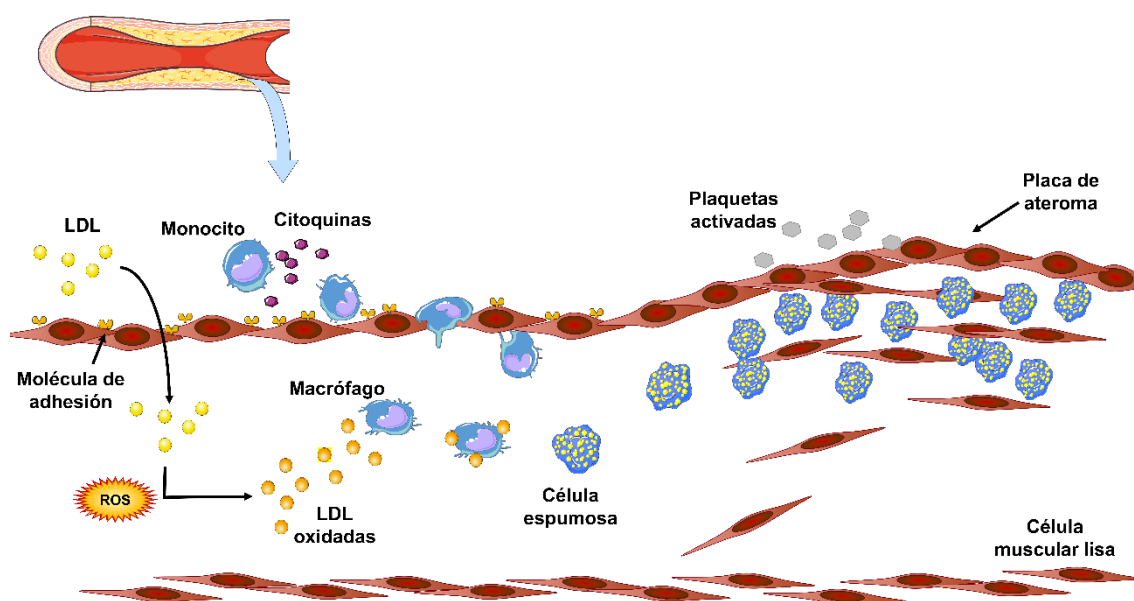


Figura 5. Patogénesis del proceso aterosclerótico. Tras un daño al endotelio, las moléculas de LDL-c pasan al espacio subendotelial donde se oxidan por los ROS. A la vez, las células endoteliales dañadas liberan citoquinas y quimioquinas y aumentan la expresión en su superficie de las moléculas de adhesión leucocitarias. Este hecho hace que los leucocitos sean atraídos hacia la pared vascular y empiecen así el proceso de migración al subendotelio convirtiéndose en células espumosas. Cuando estas células mueren por apoptosis liberan su contenido desencadenando una reacción inflamatoria. Paralelamente las células del músculo liso migran hacia el subendotelio y proliferan.

1.6.4 Dinámica de la interacción entre células endoteliales y leucocitos

La inflamación y las células del sistema inmune, como ya hemos dicho, están fuertemente relacionadas con la IR y con la evolución de la DM (Shin et al., 2016; Vozarova et al., 2002). La inflamación sistémica subyacente a la DM hace que en la circulación se encuentre un elevado número de leucocitos activados, aumentando la probabilidad de que sean reclutados hacia el endotelio y, por lo tanto, incrementando el riesgo de desarrollar la aterosclerosis.

El reclutamiento de los leucocitos comienza cuando éstos, al aproximarse al endotelio disminuyen su velocidad y empiezan a instaurar una conexión empezando a rodar sobre las células endoteliales, hasta finalmente adherirse a ellas (Leick et al., 2014). La cascada de eventos involucrada en el rodamiento, está regulada indirectamente por la liberación de quimioquinas por parte de las células endoteliales y, directamente, por la exposición de las moléculas de adhesión celular

(CAM, del inglés cellular adhesion molecules). Las CAM son proteínas de superficie de la membrana celular que se unen a receptores específicos situados en los leucocitos circulantes. Las primeras proteínas que participan en este proceso son las selectinas (Langer and Chavakis, 2009), en concreto la L-selectina (leukocyte selectin o CD62l), la E-selectina (endotelial selectin o CD62e) y la P-selectina (platelet selectin o CD62p). La L-selectina y la E-selectina tienen el papel de iniciar las interacciones leucocito-endotelio facilitando el reclutamiento hacia el endotelio y disminuyendo la velocidad de los leucocitos, permitiéndolos así establecer la fase de rodamiento (Figura 6), controlada principalmente por la P-selectina. Además de las selectinas, en las fases sucesivas del rodamiento intervienen dos inmunoglobulinas muy importantes, VCAM-1 y ICAM-1, las cuales interactúan con las integrinas localizadas en la membrana de los leucocitos a fin de instaurar conexiones más fuertes o adhesión firme (Langer and Chavakis, 2009; Schnoor, 2015). Por lo tanto, los leucocitos reclutados por ICAM-1 y por la molécula de adhesión plaqueta-endotelial (PECAM o CD 31, del inglés platelet endothelial cell adhesion molecule-1) pueden empezar su migración desde el subendotelio hacia el foco de infección (extravasación o diapédesis).

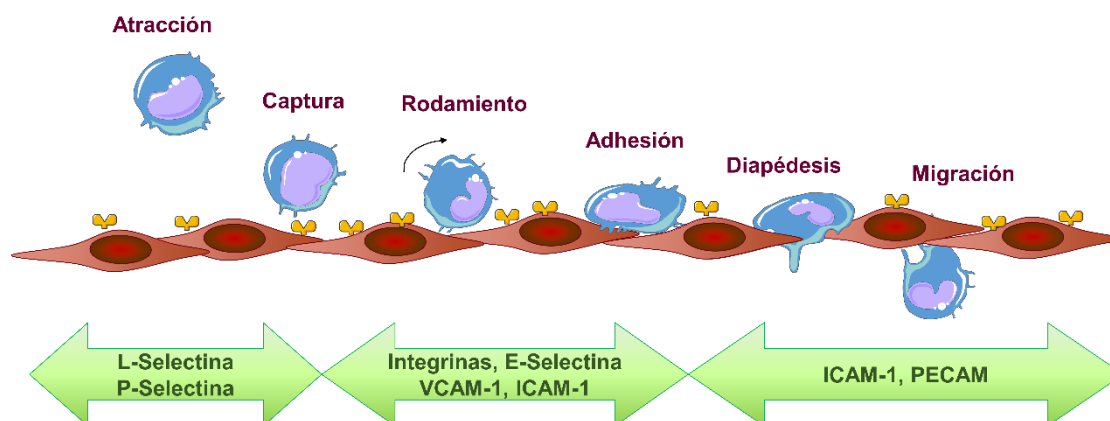


Figura 6. Mecanismos moleculares en la cascada de adhesión leucocitaria. En respuesta a un estímulo inflamatorio, los leucocitos son atraídos y reclutados hacia la pared del endotelio mediante las selectinas. En una segunda instancia, esta interacción está mediada por las integrinas, VCAM-1 e ICAM-1. Finalmente ocurre la extravasación de los leucocitos y la migración al subendotelio.

Las moléculas de adhesión además de estar expresadas por el endotelio, tras escisión proteolítica se pueden encontrar libres en la circulación sanguínea en forma soluble (Leeuwenberg et al., 1992), de manera que, sus niveles son directamente proporcionales a su expresión en el endotelio. Dada la relativa facilidad de

determinación de estas moléculas en suero, se ha podido evaluar las variaciones en sus niveles en diferentes patologías como, por ejemplo, en la DM. En este sentido, podemos encontrar en la literatura que los niveles de las moléculas de adhesión están directamente correlacionadas con el desarrollo de las placas ateroscleróticas (Dansky et al., 2001) y de otras consecuencias de la DM, como la nefropatía diabética (Navarro-González et al., 2011).

Hoy en día existen también métodos que permiten de forma bastante eficaz un estudio más directo de las interacciones de los leucocitos con el endotelio vascular. De hecho, existen métodos que permiten estudiar dichas interacciones “in vivo” mediante técnicas de imagen intravital en animales de experimentación (Herr et al., 2015; Jain et al., 2013) o bien “ex vivo” mediante microscopía acoplada a sistemas de cámaras a flujo paralelo, método empleado también en esta tesis (Ling et al., 2003).

Aunque algunos de los mecanismos involucrados en la interacción leucocito-endotelio han sido, en parte, estudiados en la DM2, (Hernandez-Mijares et al., 2013), mucho queda por conocer, al igual que en la DM1 donde se sigue conociendo muy poco sobre como este proceso pueda desarrollarse y en qué forma puede contribuir a aumentar el riesgo de CVDs. Además, se sabe que, por lo menos, en la DM2 la cascada de la adhesión está afectada por el estrés oxidativo que se produce bajo condiciones de hiperglucemia (Alom-Ruiz et al., 2008; Cook-Mills et al., 2011).

1.7 Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la diabetes

1.7.1 El estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición definida por un desequilibrio entre la producción de moléculas con capacidad pro-oxidante, como las ROS y las defensas antioxidantes (Jones, 2006). Este desequilibrio, a largo plazo, puede causar daño en los tejidos afectados. En la DM, el estado de hiperglucemia promueve la producción de ROS y, por lo tanto, está asociado al desarrollo de las complicaciones asociadas, como las CVDs. Además, en la DM2 es considerado también como uno de los principales factores claves para el desarrollo de la IR

(Burgos-Morón et al., 2019; Leloup et al., 2009). Los ROS se producen fisiológicamente en las células como productos del metabolismo celular, y están regulados por un complejo sistema de factores antioxidantes, los cuales tienen el papel de neutralizarlos evitando que se produzcan daños a causa del estrés oxidativo (Jones, 2006). Cabe destacar que dentro del entorno celular, la mitocondria es el orgánulo que produce la mayoría de los ROS presentes en el organismo y, por lo tanto, tiene un papel clave en muchos estudios dirigidos a analizar el papel de los ROS en las enfermedades en general así como en la DM en particular (Burgos-Morón et al., 2019).

1.7.2 La mitocondria

La mitocondria es el orgánulo citoplasmático celular que genera la mayor parte de la energía química necesaria para permitir la supervivencia celular. Este orgánulo junto con la NADPH oxidasa (NOX) son las dos mayores fuentes de producción de ROS. Es muy importante no olvidar que la NOX está expresada por distintos tipos celulares y que juega un papel importante no sólo en las defensas frente a microorganismos patógenos (Geiszt and Leto, 2004) sino también es un sensor de oxígeno molecular (O_2) ya que está involucrada en la regulación del tono vascular (Cave et al., 2006).

En la mitocondria la mayoría de los ROS se produce a través del proceso de la fosforilación oxidativa, la fase final de la respiración celular. Este proceso se realiza por la cadena de transporte de electrones, en la membrana mitocondrial interna y permite la síntesis de moléculas de ATP a partir de NADH y piruvato procedentes de la oxidación de glucosa en la glicolisis. Al final de la glicolisis, el piruvato es transportado desde el citoplasma a la mitocondria, donde, en presencia de O_2 es oxidado junto a CoA para formar el acetil-CoA. Este último entra en el ciclo de Krebs y es oxidado, produciendo CO_2 , H_2O , NADH y $FADH_2$. Estos últimos dos coenzimas, junto con el acetil-CoA son producidos también a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos. Por lo tanto, una hiperactivación de estas dos rutas metabólicas puede llevar a una hiperproducción de NADH y $FADH_2$, los cuales son los principales transportadores de electrones a la cadena respiratoria (Burgos-Morón et al., 2019).

La cadena de transporte de electrones consta de complejos proteicos/ enzimáticos y diferentes compuestos liposolubles capaces de crear un potencial electroquímico a través de la membrana mitocondrial mediante la creación de un gradiente de concentración de iones H^+ entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. A los cuatro complejos (I-IV) se añaden el complejo de la ubiquinona, el complejo del citocromo c, y la ATP sintetasa, o complejo V. El complejo V utiliza este gradiente electroquímico para llevar a cabo la síntesis de ATP (Elston et al., 1998). Los complejos I, III y IV están considerados “bombas protónicas” porque transportan los protones a la membrana mitocondrial interna para la generación del gradiente electroquímico utilizado por la ATP sintetasa para fosforilar el ADP a ATP (Figura 7).

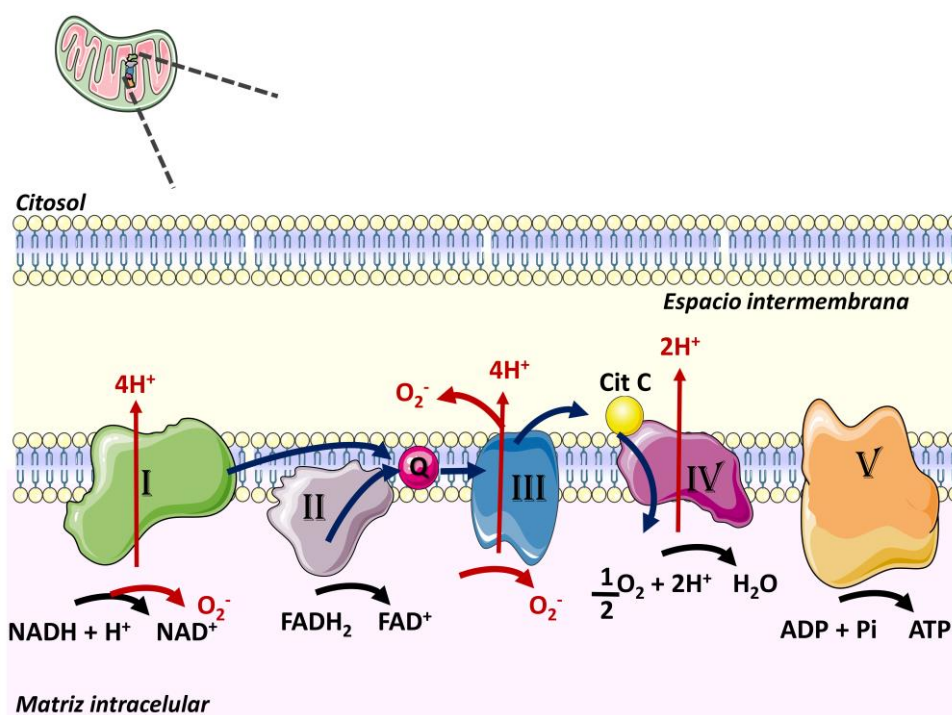


Figura 7. Cadena de transporte de los electrones y producción de radicales libres. Los complejos de la cadena de transporte I, III y IV generan un gradiente de protones (H^+) que es utilizado por la ATP sintetasa (complejo V) para generar ATP a partir de $ADP + Pi$. Paralelamente, los complejos I y III libera el anión superóxido (O_2^-). A partir de este, se pueden formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH).

Sin embargo, como todos los componentes celulares, las mitocondrias pueden estar expuestas a daño, pudiéndose provocar un desequilibrio en sus funciones (producción de ATP, regulación de la homeostasis del calcio y de los ROS) y por lo tanto disfunción mitocondrial. Sin embargo, el hecho que sea una de las mayores

fuentes de producción de ROS, hace que este orgánulo y sus componentes (DNA mitocondrial, componentes estructurales de la membrana, proteínas,...) estén continuamente expuestos a éstos, incrementando la probabilidad de daño. Aunque no disponemos de una amplia bibliografía en lo que respecta a la DM1, sí que está descrito que en la DM2 existe daño a nivel del complejo I (Hernandez-Mijares et al., 2011; Musatov and Robinson, 2012) que, como ya se ha comentado anteriormente, es la mayor fuente de ROS a nivel mitocondrial. Además, los ROS afectan también a los ácidos grasos insaturados y a los fosfolípidos de la membrana mitocondrial iniciando y desarrollando la peroxidación lipídica. La integridad de la membrana mitocondrial interna es fundamental para el mantenimiento del gradiente electroquímico. Tras un daño a la membrana mitocondrial interna, se produce una fuga de protones H^+ , la cual provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($mt\Delta\psi$, mitochondrial membrane potential). Bajo esta condición se puede desarrollar el desacoplamiento de la respiración mitocondrial y la activación de la ruta mitocondrial de las proteínas mal plegadas (UPR^{mt}, del inglés mitochondrial unfolded protein response) (Patti and Corvera, 2010; Pellegrino et al., 2013).

En estudios llevados a cabo en modelos animales, se ha demostrado que la IR puede estar modulada por la dinámica mitocondrial (Patti and Corvera, 2010). Es de destacar que la actividad mitocondrial es tejido-específica (Holmström et al., 2012), y que el daño mitocondrial a nivel muscular se traduce en una disminución en el índice de actividad de la cadena respiratoria, del consumo de O_2 mitocondrial así como del desarrollo de la IR (Kelley et al., 2002; Rabøl et al., 2009). Sin duda, la acumulación intracelular de lípidos en las células musculares (y sobretodo en los cardiomiocitos) contribuye, como ya se ha explicado en esta tesis, a la IR y al desarrollo de CVDs (Liu et al., 2018).

En conclusión, entender el origen y desarrollo del daño mitocondrial es sin duda fundamental para conocer la formación de la placa aterosclerótica y los mecanismos mediante los cuales la DM induce y favorece el desarrollo de sus comorbilidades.

1.7.3 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los ROS son moléculas muy reactivas presentes fisiológicamente en la célula y pueden tener un papel importante en la señalización celular. Por ejemplo, los ROS están implicados en la liberación de insulina por parte de las células- β pancreáticas en respuesta a los niveles de glucosa (Leloup et al., 2009).

Los ROS más importantes derivan de los complejos I y III de la cadena respiratoria, por la reducción incompleta de una molécula de O_2 durante la fosforilación oxidativa (1-2% del oxígeno total) y se pueden originar tres ROS principalmente: el $O_2^{\cdot -}$; a partir del cual mediante una dismutación por la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD, manganeso superoxide dismutase), se produce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el OH que se produce tras la hidrólisis de una molécula de agua o durante las reacciones de Haber-Weiss (en este caso la reacción es catalizada por el grupo hierro procedente de la ferritina durante la reacción inflamatoria) (Kehrer, 2000), o por otros metales de transición reducidos (Dröge, 2002) (Figura 7).

La mitocondria bajo condición de estrés puede ser también fuente de otras especies reactivas, como por ejemplo las especies reactivas del nitrógeno (RNS del inglés reactive nitrogen species). En efecto, estas RNS derivan de la reacción entre el NO (secretado principalmente por la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2, del inglés oxide nitric synthase), por los macrófagos), y el $O_2^{\cdot -}$ que termina con la producción de $ONOO^-$ (Dröge, 2002). El $ONOO^-$ a nivel del músculo liso vascular reduce los efectos del NO, y además debido a su alta reactividad, puede reaccionar con diferentes dianas biológicas y componentes celulares como los lípidos, los tioles, aminoácidos, y DNA entre otros (Guzik et al., 2002). Además, los RNS intervienen en la señalización de distintas rutas metabólicas, como por ejemplo la apoptosis, la proliferación celular o bien como sensores de la concentración de O_2 (Dröge, 2002; Phaniendra et al., 2015) para la regulación del tono vascular (Manea et al., 2015).

A pesar de que estas reacciones sean fisiológicas, si la producción de los RNS supera la capacidad de neutralización de la célula, se desencadenan reacciones patológicas, como la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos, estimulación

de la producción de enzimas leucocitarias causando daño celular y al DNA. Así mismo, una excesiva producción de ROS puede llevar al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Incalza et al., 2018; Phaniendra et al., 2015).

Existen otras fuentes de ROS, como las enzimas lipooxigenasa, la xantina oxidasa (XO o también XAO del inglés xanthine oxidase) y la MPO, que es secretada por los leucocitos y produce ROS en grandes cantidades en respuesta a la activación del sistema inmune (Gustapane et al., 2011; Kelley et al., 2002; Sugamura and Keaney, 2011).

La MPO es una enzima oxidoreductasa que está almacenada en los gránulos azurófilos de neutrófilos polimorfonucleares y monocitos y se libera durante la degranulación de los gránulos, normalmente en presencia de un proceso inflamatorio en respuesta a patógenos. Es una hemoproteína catiónica que en su forma inactiva está compuesta por una sola cadena que cuando se corta da lugar a la forma activa constituida por dos monómeros idénticos formados por una cadena ligera y una pesada ligadas por un puente de disulfuro. La MPO cataliza la reacción de formación del ácido hipocloroso a partir del ión cloruro (Cl^-) y el H_2O_2 , contribuyendo en este sentido a la formación de ROS (Winterbourn and Kettle, 2000). La MPO tiene diferentes funciones: entre ellas oxida las LDL, facilitando así su acúmulo en las células espumosas, inhibe la acción del NO y ejerce otras propiedades pro oxidantes y antiinflamatorias. Por lo tanto, se considera un marcador temprano que relaciona el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial mediante el desarrollo del proceso aterosclerótico (en particular es un indicador de la estabilidad de la placa de ateroma), incrementando, de esta manera, el riesgo de desarrollar arterosclerosis u otras CVDs (Anand and Anand, 2012; Gustapane et al., 2011; Klebanoff, 2005; Rovira-Llopis et al., 2013).

También la hiperglucemia puede ser fuente indirecta de ROS. En la literatura está descrito que las variaciones en la concentración de glucosa en sangre son un estímulo importante en la generación del estrés oxidativo en la DM. De hecho, el estrés oxidativo en la DM1 está llevado a cabo por variaciones en la homeostasis de la glucosa y por la respuesta autoinmune, mientras que en la DM2 únicamente por las variaciones en las concentraciones de la glucosa. A su vez, se ha descrito *in vitro*

por ejemplo que cultivando células endoteliales a concentración variable de glucosa (de 5 a 30 mmol/L) se produce un aumento significativo en los ROS citosólicos (Nishikawa et al., 2000). Además, *in vivo*, se ha descrito que la glucosa promueve un estado de estrés oxidativo actuando por 4 rutas de señalización (Brownlee, 2005):

1. La generación de productos avanzados de glicosilación (AGEs del inglés advanced glycation end products). Las cuatro rutas empiezan con la inhibición de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH del inglés glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), la cual participa en la glicólisis. Aunque los principales AGEs son las proteínas, la glicosilación puede afectar a los lípidos y a los ácidos nucleicos. En este caso, las proteínas glicosiladas en sus grupos amino, pierden funcionalidad y se pueden unir al receptor (RAGE, del inglés receptor of advanced glycation end products), desencadenando la producción de ROS tanto citosólicos como mitocondriales (Brownlee, 2005; Coughlan et al., 2009). Además, el incremento de AGEs en pacientes con DM2 está correlacionado con el desarrollo de CVDs (como la enfermedad ateroscoronaria y la nefropatía diabética), así como en pacientes con defecto en la secreción de insulina (Coughlan et al., 2011).

2. La activación de la PKC. La presencia de elevadas concentraciones de glucosa, promueve la síntesis de novo de diacilglicerol, el cual activa la PKC. La PKC forma parte de distintas rutas celulares; por ejemplo, promueve la activación del factor de crecimiento vascular endotelial (VGF, del inglés vascular endothelial growth factor) y favorece la inflamación a través de la ruta de NF- κ B. Con respecto a su papel en la generación de ROS, en condiciones de hiperglucemia, PKC contribuye al aumento de los ROS aumentando el desacoplamiento de la eNOS y la activación de la NADPH oxidasa (157 Daiber, A. 2019). Aparte de estas acciones, la PKC reduce la biodisponibilidad de NO en el endotelio contribuyendo al desarrollo de CVDs (Beckman et al., 2002).

3. La conversión de glucosa a sorbitol. El daño oxidativo favorece la conversión de la glucosa al polialcohol sorbitol. El polialcohol sorbitol afecta a los niveles de

NADPH causando su descenso y provocando una menor generación de glutatión reducido y, en consecuencia, de estrés oxidativo (Brownlee, 2005).

4. La señalización por hexosamina. El aumento de la fructosa-6-fosfato provoca la formación de O- β -N-acetilglucosamina (O-GlcNAc del inglés O-linked N-acetylglucosamine) y, en consecuencia, un aumento de la biosíntesis de hexosamina. Por otro lado, la O-GlcNAc promueve la expresión del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β , del inglés transforming growth factor beta) el cual tiene el poder de interferir en la homeostasis vascular (Gurel and Sheibani, 2018; Zachara and Hart, 2006).

Otro factor participante en la generación del estrés oxidativo es la hiperlipemia: ya que la elevada concentración de ácidos grasos presente en la DM promueve la activación de la NADPH oxidasa y, en consecuencia, favorece la generación de ROS (Inoguchi et al., 2000; Spahis et al., 2017), además de favorecer la formación de placas ateroscleróticas.

1.7.4 Defensas antioxidantes

Para poder neutralizar los ROS, la célula cuenta con diferentes estrategias antioxidantes. Entre ellas, la superóxido dismutasa (SOD, del inglés superoxide dismutase) que convierte el O_2^- en H_2O_2 y O_2 molecular mediante una reacción de combinación con dos moléculas de H^+ ; la catalasa, que actúa sobre el H_2O_2 transformando dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O y una de O_2 ; la enzima glutatión peroxidasa (GPX, del inglés glutathione peroxidase) que actúa sobre el H_2O_2 y también sobre el radical OH^\cdot dando como resultado dos moléculas de H_2O y una de glutatión disulfuro (GSSG del inglés glutathione disulfide), producido por la oxidación del glutatión (GSH del inglés glutathione) (Brown and Griendling, 2015). Es de destacar que el cociente GSH/GSSG es un buen indicador de la capacidad antioxidante celular y de su estado oxidativo.

Otro sistema que contribuye a la homeostasis del equilibrio redox es el mecanismo regulador de la transcripción de genes antioxidantes regulado por el factor de transcripción NF-E2 (Nrf2, del inglés transcription factor NF-E2-related factor-2) y el elemento de respuesta antioxidante (ARE, del inglés antioxidant responsive element) (Johnson et al., 2008; Lu et al., 2016). Normalmente este factor de

transcripción está ligado a su inhibidor, la proteína-1 asociada a ECH similar a Kelch (KEAP1, del inglés Kelch-like ECH-Associating protein 1); cuando se libera de KEAP1, se transloca al núcleo y se une a ARE iniciando su transcripción (Lu et al., 2016).

Además de este sistema, hay otro sistema antioxidante muy importante, el sistema de las sirtuínas. Las sirtuínas pertenecen a una clase de enzimas desacetilasas dependientes de NAD^+ mitocondrial que participan en la regulación del metabolismo y la función mitocondrial modulando la proliferación, la diferenciación, la longevidad celular y la respuesta al estrés entre otras (Bause and Haigis, 2013; Sack and Finkel, 2012). La más importante en este sentido es la sirtuína 3 (SIRT3, del inglés sirtuin 3), nombrada también el “guardián” de la homeostasis mitocondrial; ésta tiene el papel de unirse y desacetilar varias enzimas metabólicas y respiratorias reguladoras de las principales funciones mitocondriales (ej. MnSOD) (Onyango et al., 2002; Tao et al., 2010); de modular la producción de ROS en la cadena de transporte de electrones y activar el sistema de defensa contra el estrés oxidativo (ej. activación de enzimas antioxidantes) (Ahn et al., 2008; Onyango et al., 2002), protegiendo así la célula del daño oxidativo y, a la vez, promover la muerte celular en condiciones de estrés (Someya et al., 2010).

Otros sistemas antioxidantes incluyen a la vitamina A (o retinol), la cual interactúa en la ruta de la PKC, reduciendo la producción de ROS (Imam et al., 2001); la vitamina C (o ácido ascórbico), la cual inhibe $\text{I}\kappa\kappa\beta$ y, por lo tanto, la cascada de señalización de NF- κ B (Cárcamo et al., 2004); y la vitamina E (o tocoferol), la cual inhibe la acción de la PKC y también actúa neutralizando los ROS por acción directa debido a su estructura química (Lloret et al., 2019). Además, se ha demostrado en algunos estudios que, estos antioxidantes, si son suministrados a pacientes diabéticos no obesos pueden producir efectos beneficiosos en términos de reducción del estrés oxidativo y de mejoría de la función endotelial vascular (Montero et al., 2014).

1.7.5 El inflamasoma NLRP3

El inflamasoma es un componente fundamental en el sistema de la inmunidad innata que actúa como sensor y mediador de la inflamación. El inflamasoma NLRP3 es un complejo multiproteico formado por sensores intracelulares acoplados a un sistema de activación de las proteínas de la familia de las caspasas y la maduración proteolítica (mediada por la caspasa-1) de las interleuquinas proinflamatorias IL-1 β y la maduración de la IL-18 (De Nardo and Latz, 2011; Harijith et al., 2014). Estas dos últimas, y en particular la IL-1 β participa en el proceso de reparación de tejidos tras un proceso inflamatorio, entre ellos el endotelio vascular (Martinon et al., 2009).

Los inflamasomas pertenecen a la familia de receptores tipo NOD (del inglés nucleotide-binding oligomerization domain). Los receptores NOD son receptores citosólicos cuya función es reconocer los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés Pattern recognition receptor) citosólicos. Los PRR tienen la función de reconocer a su vez los diferentes dominios estructurales celulares activadores de inflamasoma: los patrones moleculares asociados a un patógeno (PAMP, del inglés pathogen associated molecular patterns) y los patrones moleculares asociados a un daño (DAMP, del inglés damage associated molecular patterns). Ambos, PAMP y DAMP se expresan constitutivamente en células inflamatorias o del sistema inmune, como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Fullard and O'Reilly, 2015; Martinon et al., 2009).

El receptor más estudiado de esta familia es el receptor dominio de oligomerización de nucleótidos-similar de tipo 3 (NLRP3, del inglés NOD-like receptor Pyrin domain containing), que está constituido por un dominio central de unión y oligomerización de nucleótidos (NACHT, del inglés nucleotide binding and oligomerization domain) común a todos los receptores NLRs, al cual se unen a la extremidad C-terminal un dominio PYD constituido por uniones de pirina y una secuencia repetitiva rica en leucinas (LRR, del inglés leucine-rich repeats domain), y a la extremidad N-terminal la proteína adaptadora asociada a apoptosis

conteniendo un dominio de reclutamiento de la caspasa (ASC, del inglés apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain). ASC está formada por el unión de un dominio N-terminal PYRIN-PAAD-DAPIN, también conocido como PYD (PYRIN, del inglés pyrin domain - PAAD, del inglés pyridine aldehyde adenine dinucleotide - DAPIN, del inglés domain in apoptosis and interferon response) tiene el papel de facilitar la unión entre los NLRP3 (Dinarello, 2009; Stehlik, 2007) (Figura 7).

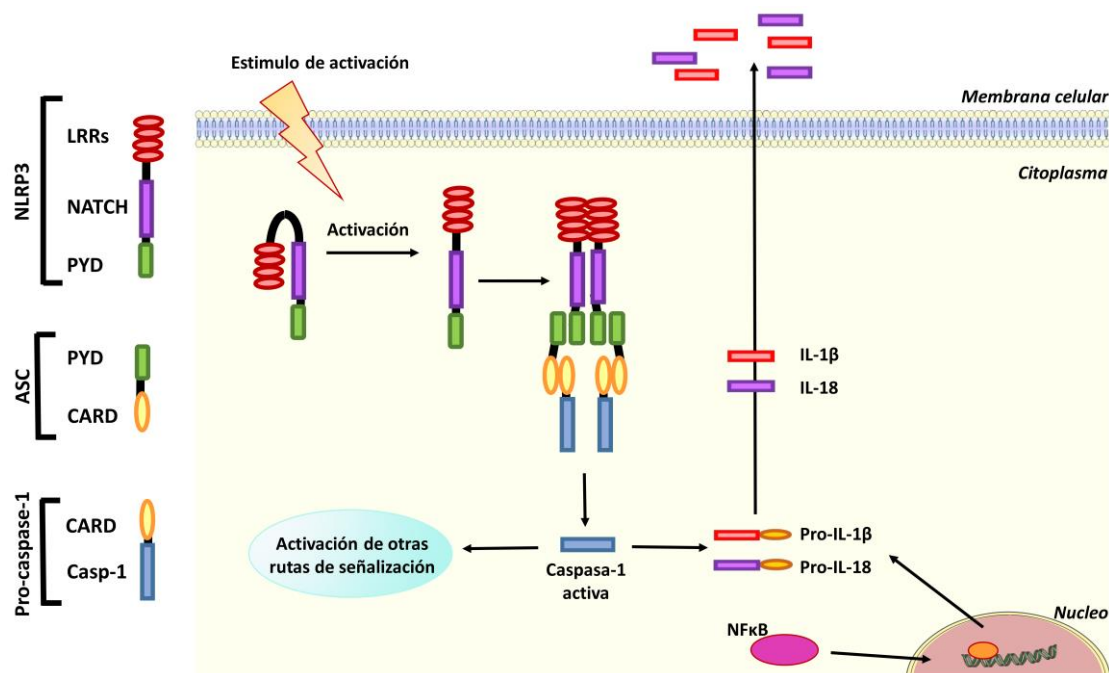


Figura 8. Estructura y funcionamiento del inflamasoma NLRP3. Tras un estímulo de activación, el complejo del inflamasoma NLRP3 sufre una modificación conformacional y se une a otros inflamasomas formando un complejo. Este, mediante el dominio CARD opera la escisión proteolítica de la procaspasa-1; esta última media la activación de las pro-IL-1 β y de la pro-IL18 procedente da activación transcripciones mediada por NF κ B.

1.7.5.1 Activación canónica, no-canónica y alternativa del inflamasoma NLRP3

La activación del inflamasoma se regula a nivel transcriptional y post-transcriptional, hecho que subraya la importancia de esta plataforma multiproteica. Normalmente, el inflamasoma está presente en el citoplasma de forma inactiva, y, aunque no está completamente claro su mecanismo de activación, en la literatura hay evidencias que ésta puede lograrse por distintas señales (Bandyopadhyay et al., 2013) y a través de varias rutas (Figura 9). Las tres principales vías de activación del

inflammasoma NLRP3 están definidas como activación canónica, no canónica y alternativa.

1. Activación canónica. Es un proceso que necesita de dos señales para poderse realizar: una señal de priming y una de activación del inflammasoma. En la fase de priming, el estímulo procedente de un PPR empieza una cascada de señalización llevada a cabo por la ruta del receptores tipo toll (TLR, del inglés tool-like receptor)/caspara 8/ NFκB, como por ejemplo ATP, toxinas bacterianas o RNA viral. Además de estos, se ha descrito que esta ruta puede ser activada también por otros factores, como el flujo de iones potasio (K^+) o iones Ca^{2+} , ROS y DNA mitocondrial (mtDNA) (Dinarello, 2009; Man and Kanneganti, 2015). El estímulo de priming lleva por un lado al aumento de la expresión de NLRP3, y por otro aumenta la expresión de la pro IL1-β mediada por NFκB (Bauernfeind et al., 2009). La segunda señal es dada por un PPR (PAMPs o DAMPs, el cual tiene el papel de activar funcionalmente el complejo de NLRP3. Paralelamente a este proceso, se lleva a cabo la deubiquitinación por parte de la proteína BRCC3, y la fosforilación del dominio ASC. Tras estos eventos, NLRP3 sufre una modificación conformacional que induce su activación y oligomerización en un tetrámero, permitiendo el ensamblaje de la plataforma multiproteica compuesta por NLRP3, el adaptador ASC, y la pro-caspasa-1 (Juliana et al., 2012). La pro-caspasa está formada por 2 componentes activos conocidos como p10/p20. La liberación y activación de la caspasa-1 se realiza por escisión proteolítica realizada por la caspasa-14, una caspasa activadora presente en el citoplasma. La caspasa-1 así activada, promueve la transición de las interleuquinas IL-1β y IL-18 de la forma inactiva a la forma activa las cuales a su vez activan la cascada inflamatoria (Hayward et al., 2018; Pellegrini et al., 2017). La activación del inflammasoma tiene un papel clave en la historia natural de la inflamación y, sobre todo, concurre a la realización de la piroptosis, un tipo de muerte celular llevada a cabo por la ruta de las caspasas.

2. Activación no canónica. Esta ruta es iniciada por las bacterias Gram-negativas (ej., *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*). La primera señal de activación es dada por la presencia de lipopolisacáridos (LPS, del inglés lipopolysaccharides) en el citosol (Kayagaki et al., 2011; Shi et al., 2014). El LPS activa las vías de señalización del TLR4 induciendo la expresión de la proIL-1β, de las proteínas

NLRP3 y del interferón de tipo 1 (IFN1, del inglés type 1 interferons). El IFN1 induce la expresión de la caspasa-11, la cual, a su vez es activada por el LPS junto con la caspasa-4 y la caspasa-5, activando el inflamasoma NLRP3 y realizando la activación proteolítica de las IL-1 β e IL-18 (Hayward et al., 2018; Man and Kanneganti, 2015; Pellegrini et al., 2017; Wacker et al., 2017).

3. Activación alternativa. Esta ruta es exclusiva de los monocitos y está mediada por activación directa del TLR-4 pero no por la concentración de potasio (K⁺) (Dinarello, 2009; Gaidt and Hornung, 2017). Sin embargo, la activación de esta vía sigue siendo investigada principalmente en estudios murinos, aunque existan estudios que confirman diferencias importantes entre el sistema inmune humano y el murino (Khare et al., 2012; Sha et al., 2014; Wen et al., 2013). Los monocitos, protagonistas principales en respuesta inmune, secretan IL-1 β de forma independiente de la activación del inflamasoma (Dinarello, 2009), y este hecho es fundamental para considerar a los monocitos mismos como el “primer estímulo” para que la activación canónica induzca la transcripción de la pro-IL-1 β . El único efector de esta ruta es el receptor TLR4, el cual activa la caspasa 8, permitiendo la maduración de la pro-IL-1 β (Gaidt et al., 2016).

Vías de la activación del inflamasoma NLRP3

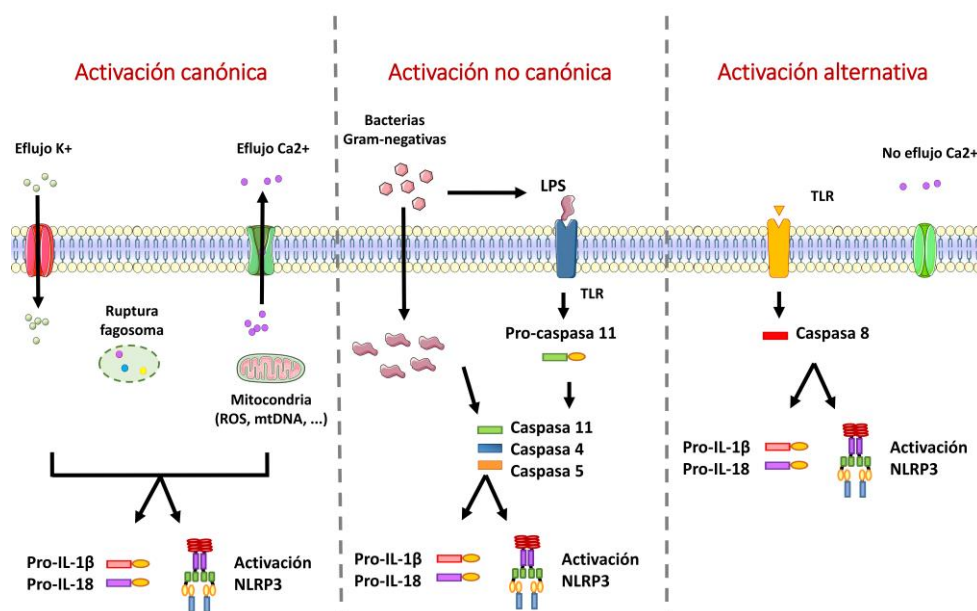


Figura 9. Rutas de activación del inflamasoma NLRP3. En la ruta de activación canónica del inflamasoma, la señal de activación puede proceder de distintos estímulos (eflujo de iones K⁺ o Ca²⁺, daño mitocondrial, ROS, etc); en la ruta de activación no canónica, la primera señal es dada por la presencia del LPS procedente de bacterias Gram-negativas, el cual se une al TLR4 induciendo la transcripción de la caspasa 11. El LPS presente en el citosol (segundo estímulo) es directamente reconocido por la caspasa 4, 5 y 11, y las activa, llevando a la

activación del complejo NLRP3; en los monocitos, la iniciación de la ruta alternativa es dada por el TLR-4, el cual promueve la activación de la caspasa 8 y, por lo tanto, del complejo del inflamasoma NLRP3.

El inflamasoma puede ser activado también por los ROS mediante la proteína quinasa de activación mitogénica (MAPK, del inglés mitogen-activated protein kinases) o la proteína quinasa de señal extracelular (ERK1/2, del inglés extracellular signal-regulated kinase 1/2) (D'Espessailles et al., 2018; McCubrey et al., 2006). Además, puede ser activado también por las sirtuina-1 (SIRT-1, del inglés sirtuin-1) (Li et al., 2017, 2016; Zarzuelo et al., 2013), o tras la generación de ROS mitocondriales (Shio et al., 2009).

Por último, se ha visto que NFκB juega un papel clave en la activación del inflamasoma NLRP3. En este sentido, algunos estudios *in vitro* demuestran que tras tratamientos con inhibidores de NFκB, la expresión de NLRP3 está reducida de forma dosis-dependiente en cultivos celulares, confirmando que NFκB es necesario a la activación de NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009).

1.7.5.2 Relación entre el inflamasoma NLRP3 y el sistema inmune

Los inflamasomas forman parte de los componentes de la inmunidad innata y juegan un papel muy importante en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa ya que tiene un papel clave en la regulación del proceso inflamatorio mediante la liberación de la IL-1β y de la IL-18. Estas dos últimas además están producidas por los macrófagos activados.

El inflamasoma NLRP3 está correlacionado con diferentes enfermedades autoinflamatorias, entre ellas la aterosclerosis, la obesidad y la DM2 y las enfermedades intestinales (Menu and Vince, 2011; Ozaki et al., 2015), y en algunas enfermedades autoinmunes como el Síndrome de Muckle-Wells o la urticaria familiar por frío y en algunas enfermedades inflamatorias poligénicas como la gota (Suresh and Mosser, 2013). Además, hay estudios que demuestran que la cantidad de FFAs ingeridos o en condiciones de hipercolesterolemia podrían regular la activación del inflamasoma NLRP3 y aumentar la producción de IL-1β por parte

de los adipocitos, participando en el desarrollo de la IR (Engin, 2017; Haneklaus and O'Neill, 2015; Legrand-Poels et al., 2014; Xing et al., 2019). De hecho, se ha visto que la proteína desacoplante mitocondrial (UCP2, del inglés mitochondrial uncoupling protein-2) es un modulador clave en la activación de la FFA sintasa, dando lugar a la activación del inflammasoma mediada por los lípidos (Moon et al., 2015).

Sin duda, una etapa fundamental para el desarrollo de la acción del inflammasoma es la biodisponibilidad de pro-IL-1 β y pro-IL-18, que se producen durante el proceso inflamatorio. En este sentido, la familia de las IL-1 y el inflammasoma constituyen una diana terapéutica muy atractiva en distintas enfermedades, entre ellas la DM2.

1.8 Manejo clínico de la diabetes y tratamiento

Considerando a la DM1 y la DM2 distintas entre ellas por la causa de la base del desarrollo de la enfermedad, también los tratamientos son distintos, aunque algunos fármacos pueden ser empleados para ambas patologías. El tratamiento principal empleado en el tratamiento de la DM1 es la insulina. Los pacientes con DM1 muestran desde el principio un déficit de esta hormona y, por lo tanto, el tratamiento se dirige a paliar el déficit del funcionamiento de las células- β y de esta manera evitar el desarrollo de un estado de cetoacidosis (American Diabetes Association, 2013).

En los pacientes con DM2, sobretodo en la fase de pre-diabetes y las fases tempranas de la enfermedad, antes de empezar el tratamiento farmacológico se intenta siempre manejar la hiperglucemia aportando cambios en el estilo de vida, es decir, promoviendo la actividad física y un hábito de una dieta saludable. Sin embargo, se ha demostrado que distintos fármacos empleados como la tiazolidinedionas (que aumentan la sensibilidad a la insulina y mejoran la funcionalidad de las células β), las sulfonilureas (que aumentan la secreción pancreática de insulina) y la insulina misma pueden estar asociados a un aumento de peso, por lo que y aunque son efectivos en cierta manera y dadas las consecuencias no deseables de estos fármacos, la investigación se ha dirigido hacia la búsqueda de nuevos fármacos que permitan controlar la glucemia a través de

otras rutas metabólicas (Brown et al., 2017; Russell-Jones and Khan, 2007; Van Gaal and Scheen, 2015). Entre los grupos de fármacos más utilizados, se encuentran los inhibidores del receptor GLP-1 (aumentando los niveles plasmáticos de la hormona), los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4, que bloquean la degradación de la incretina inhibiendo la secreción de glucagón y promoviendo la de la insulina) y la metformina, fármaco ampliamente utilizado durante décadas y que a su vez provoca una pérdida de peso (Malin and Kashyap, 2014).

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado otro grupo de fármacos entre los que se incluyen los inhibidores del cotransportador SGLT-2 (iSGLT2).

1.8.1 El riñón: un silencioso actor en la homeostasis de la glucosa

Con el fin de controlar la homeostasis de la glucosa mediante otras vías que no estén directamente relacionadas con los niveles de insulina, los diferentes estudios se han centrado en la búsqueda de otros “actores” muy importantes en este proceso, entre ellos, el riñón. Éste, ha sido siempre considerado fundamental para el equilibrio hidroelectrolítico y sólo en los últimos años, también ha sido considerado como un órgano diana para la regulación del metabolismo glucídico. De hecho, este órgano participa en la regulación de los niveles de glucosa mediante la vía de la gluconeogénesis (la cual se activa bajo condiciones de ayuno), y mediante el proceso de filtración glomerular y reabsorción de la glucosa en los túbulos contorneados proximales, evitando que la glucosa se pierda a través de la orina. Cada día, el riñón filtra alrededor de 180g de glucosa, y solo <1% se excreta en la orina (Wright, 2001). Cuando la glucosa llega al riñón pasa por el glomérulo y llega al sistema de túbulos renales, donde la carga de glucosa tubular, (aproximadamente 120 mg/min) es reabsorbida totalmente. Sin embargo, si ésta excede los 220 mg/min (límite denominado «umbral de glucosa»), la glucosa atraviesa el filtro renal y es excretada por la orina. Para que la glucosa tubular exceda el umbral de la glucosa, se ha estimado que la concentración plasmática de glucosa debe ser alrededor de 130 y 300 mg/dL, pudiendo haber claro está, variaciones por edad, sexo (aumenta en las mujeres), etnia y diabetes (Butterfield et al., 1967). La reabsorción de la glucosa es llevada a cabo por las células epiteliales de los capilares

peritubulares a través de los receptores SGLT. Esta familia incluye numerosas proteínas de membrana involucradas en el transporte de glucosa, iones, aminoácidos y osmolitos. Entre ellas, las más importantes implicadas en este proceso son los cotransportadores SGLT-1 y SGLT-2. El primero es un transportador de baja capacidad y de alta afinidad localizado en el segmento recto S3 del túbulo proximal descendente y reabsorbe sólo el 10% de la glucosa tubular. El segundo es un transportador de gran capacidad y de baja afinidad y está anatómicamente localizado cerca del SGLT-1, exactamente en el segmento contorneado del túbulo proximal y reabsorbe hasta el 90% de la glucosa filtrada (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2008), convirtiéndolo en una interesante diana farmacológica para el manejo de la hiperglucemia. Bajo condición de DM, se ha visto en modelos animales y en estudios en humanos que la capacidad máxima de reabsorción es más alta en los modelos con DM1 frente a los DM2 (Kamran et al., 1997; Mogensen, 1971).

1.8.2 iSGLT2: La Empagliflozina como tratamiento terapéutico en la DM2

Los iSGLT2 son una clase de fármacos antidiabéticos orales empleados en la DM (oral anti-diabetic drugs, OAD) que actúan inhibiendo el cotransportador SGLT-2. El SGLT2 tiene el papel de transferir el sodio y la glucosa al citoplasma de las células tubulares mediante un mecanismo de transporte secundario Na^+ -glucosa, o bien aprovechando el gradiente de energía que se crea de la reabsorción de sodio (Anders et al., 2016; Wright, 2001) (Figura 10). A la vez, en la membrana basolateral, el receptor GLUT-2 transfiere estas moléculas de glucosa desde el espacio intracelular hasta el intersticio y la circulación mediante un mecanismo de transporte facilitado por la ayuda de la actividad Na^+/K^+ ATPasa (Freitas et al., 2008).

El primer fármaco capaz de causar glucosuria descubierto se remonta al 1835 cuando se aisló de la corteza del manzano, la florizina, molécula capaz de inhibir los receptores SGLT-1 y SGLT-2 (Rossetti et al., 1987). Su mecanismo de acción no selectivo, ha limitado su utilización en humanos, ya que el receptor SGLT-1 está presente también en el trato gastrointestinal donde está implicado en la reabsorción

de la glucosa intestinal. Además, se demostró que no era lo bastante estable para ser absorbido por el trato gastrointestinal. Actualmente, se han desarrollado moléculas análogas a la florizina, entre las cuales se encuentran la dapagliflozina, la canagliflozina y la Empagliflozina.

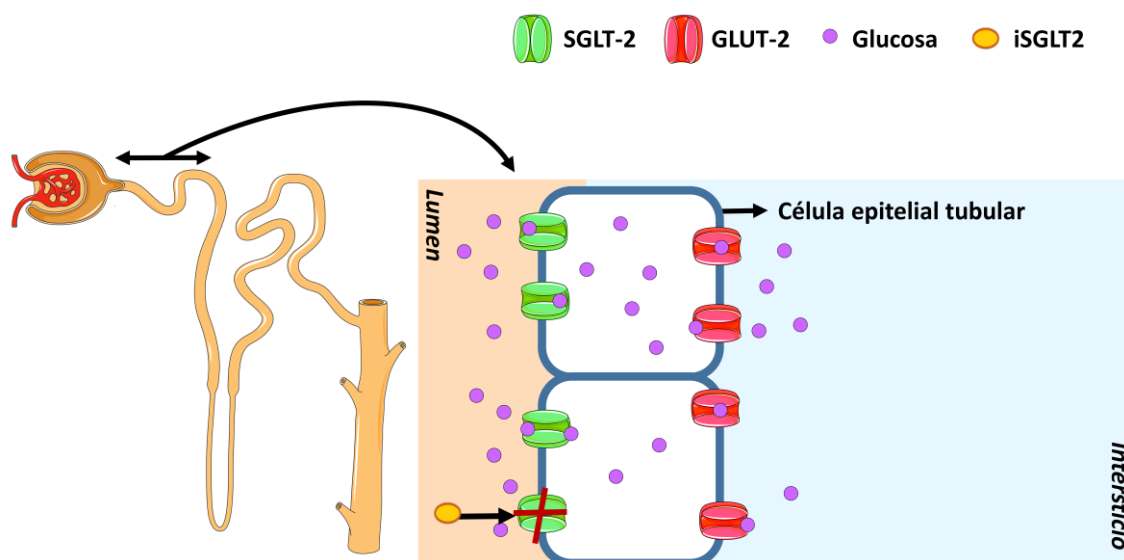


Figura 10. Mecanismo de acción de los iSGLT2. Los cotrasportadores SGLT-1 y SGLT2 en el riñón llevan a cabo la reabsorción de la glucosa aprovechando el gradiente electroquímico que se crea durante el transporte del ion sodio (Na^+). De esta manera, la glucosa así es libre de pasar con el ayuda del receptor GLUT-2 al torrente sanguíneo evitando que se excrete en la orina. El iSGLT-2 actúa inhibiendo este receptor así que es incapaz de seguir funcionando, y, por lo tanto, la cantidad de glucosa que se reabsorbe es menor.

Estos fármacos al no interferir directamente en la ruta de la insulina se utilizan en la práctica clínica en monoterapia o bien en terapia combinada con los antidiabéticos orales “clásicos” o la insulina (Abdul-Ghani et al., 2011). Algunos estudios han observado que el uso de iSGLT2 puede mejorar la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina (Ferrannini et al., 2014; Merovci et al., 2014), así como promover la secreción de glucagón (Bonner et al., 2015). Además, como se ha demostrado también por el estudio EMPA-REG, estos fármacos están también asociados a una reducción del peso corporal y de la tensión arterial (Pham and Chilton, 2017; Rajasekeran et al., 2016) y, por lo tanto, se asocian a una protección contra la obesidad (Ferrannini et al., 2015) y a nivel cardiovascular disminuyen el riesgo de este tipo de enfermedades (Ferrannini et al., 2015; Pham and Chilton, 2017; Rajasekeran et al., 2016; Zinman et al., 2015).

Por el contrario, tienen también algunos efectos adversos. Entre ellos, existe el riesgo de desarrollar infecciones del tracto urinario debido a la reducción del volumen intravascular secundario a la elevada diuresis; el riesgo de incurrir en el desequilibrio hidroelectrolítico; y de nefrotoxicidad por la acumulación de productos finales de AGE (Esteban-Jiménez et al., 2018; Morales-Olivas, 2016).

2. OBJETIVOS

La DM es una enfermedad que, independientemente de su historia natural, conlleva un riesgo intrínseco de desarrollar comorbilidades como obesidad, hipertensión, hipercolesterolemia y CVDs. Estas últimas son el resultado no sólo de la hiperglucemia, factor crítico en la DM sino también del estrés oxidativo, del proceso inflamatorio crónico y de la constante activación de los componentes del sistema inmune.

Con estas premisas, está claro el papel de la homeostasis de la glucosa y el sistema inmune en la patogénesis tanto de la DM como en el desarrollo de sus comorbilidades, en particular las CVD. De hecho, la inflamación crónica conlleva a una hiperactivación de los leucocitos, favoreciendo su reclutamiento al endotelio, fomentando el daño endotelial, la producción de ROS y la disfunción celular (de los leucocitos y de las células endoteliales).

Sin duda, hay que realizar más estudios para llegar más allá de lo que sabemos hoy en día y arrojar luz sobre los mecanismos mediante los cuales actúa la hiperglucemia y cuáles son los factores que median la activación de los PMNs, su reclutamiento por parte del endotelio vascular y las relaciones con la activación del inflammasoma. Sin embargo, a fin de mantener un óptimo control glicémico en estos pacientes, y de prevenir variaciones frecuentes en la homeostasis de la glucosa, en los últimos años se están desarrollando nuevas clases de fármacos que actúan de forma insulín-independiente, como por ejemplo los iSGLT2.

En este sentido, los PMNs son actores principales en la respuesta inflamatoria y en la disfunción endotelial, transformándose en una diana atractiva para el estudio del proceso inflamatorio que subyace a la DM y de sus comorbilidades.

A tal fin, en la presente tesis doctoral nos planteamos investigar sobre diversos aspectos donde existen vacíos en el conocimiento. Por lo tanto, hemos establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar las interacciones leucocitos-endotelio y explorar tal relación y su correlación con la producción ROS y la disfunción mitocondrial en leucocitos de pacientes con DM1 y sus respectivos controles.

2. Evaluar el papel del control glicémico en la activación del inflamasoma NLRP3 en pacientes con DM2.

3. Evaluar el efecto del iSGLT2 empagliflozina sobre el perfil inflamatorio y la respuesta antioxidante en leucocitos procedentes de pacientes con DM2 y sus respectivos controles.

3. PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La DM es una enfermedad de fuerte impacto socio-sanitario, y es considerada en los países desarrollados como una de las epidemias del siglo XXI junto con la obesidad. Mientras la DM1 depende de factores genéticos y étnicos, la DM2 está principalmente relacionada con la obesidad y la IR (se estima que un 14% de los sujetos obesos desarrollan DM2). Dentro de las causas de la obesidad, se determinan diferentes factores como estilos de vida inadecuados, el sedentarismo y una alimentación poco saludable. Estos factores favorecen el desarrollo de la obesidad, y por consiguiente el desarrollo de CVDs.

En la presente tesis doctoral, hemos pretendido investigar diferentes áreas temáticas con un componente común de investigación básica traslacional, así como intentar elucidar los diferentes mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología de la DM. Además, hemos evaluado el efecto que esta enfermedad tiene sobre los leucocitos circulantes de dichos pacientes y su asociación con el riesgo de desarrollar CVDs, así como las asociaciones entre la DM y los mecanismos subyacentes a la inflamación crónica presente en dicha enfermedad y el papel fundamental que puede ejercer el control glucémico sobre dichos mecanismos.

Durante el transcurso de la presente tesis doctoral, hemos desarrollado tres estudios observacionales evaluando tres cohortes de pacientes con DM1 y DM2, establecidas según los criterios de la ADA (American Diabetes Association, 2013), así como sus correspondientes controles. Dichos pacientes acudieron al Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia para su tratamiento y seguimiento habitual. A su vez, se ha incluido en los estudios una cohorte de sujetos controles sanos voluntarios, creando grupos ajustados por edad y sexo. Todos los estudios han sido realizados a partir de muestras de suero y de leucocitos aislados de sangre periférica. En este trabajo, hemos seleccionado los leucocitos para evaluar los diferentes mecanismos moleculares que intervienen bajo condición de DM porque son células representativas del estado de activación del sistema inmune de dichos pacientes y, sobretodo, porque los leucocitos son representativos del estado redox del organismo, siendo uno de los principales tipos celulares implicados en la formación de la placa de ateroma, primer paso hacia la aterosclerosis y el desarrollo de las CVDs (Weber and Noels, 2011).

Todos los pacientes que se estudiaron estaban bajo tratamiento con antidiabéticos tales como: Humalog, Novorapid o Fiasp (insulinas rápidas), o bien Tresiba o Toujeo (insulinas lentas) para la cohorte de pacientes con DM1; metformina, inhibidores de DPP-4, sulfonilureas, glinidas, tiazolidinedionas y empagliflozina para la cohorte de pacientes DM2.

Por lo general, y como era lo esperado, tanto los pacientes DM1 como los pacientes DM2 mostraron alteraciones en la homeostasis de la glucosa, presentando elevados niveles plasmáticos de glucosa en ayunas y un porcentaje de A_{1c} significativamente superior con respecto a los controles sanos. Por el contrario, los pacientes DM1 no presentaban otras diferencias significativas con respecto al grupo control, muy probablemente debido a los tratamientos farmacológicos prescritos a estos pacientes. Sin embargo, en los pacientes DM2, se encontraron valores elevados en el BMI, en el perímetro de la cintura y en la presión arterial, junto a un aumento del índice HOMA-IR, de la insulina (no medidos en los pacientes DM1) y alteración en el metabolismo lipídico característico de la dislipidemia aterogénica (definida como hipertrigliceridemia acompañada por niveles reducidos de HDL-c y aumento de las partículas de LDL-c pequeñas y densas). Además, es de destacar que los parámetros relativos al metabolismo hidrocarbonado están correlacionados con los niveles de A_{1c}. Este factor es muy importante porque, debido a la falta de un adecuado control glicémico, se ha visto que cuando los valores de A_{1c} superan el 7% empieza a subir el riesgo de desarrollar CVDs sobre todo a nivel microvascular pudiendo dar lugar a la aparición de nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética (American Diabetes Association, 2013; Pyörälä et al., 1997; Stratton et al., 2000).

El aumento del riesgo de CVDs debido a los niveles de A_{1c} junto a un aumento en los niveles de colesterol son los principales motivos por los cuales, a los pacientes diabéticos, se les añade generalmente un tratamiento hipolipemiente. De hecho, en estos pacientes el transporte del colesterol está alterado (Borggreve et al., 2003), haciendo que las partículas de LDL-c que participan en el proceso de aterosclerosis sean más pequeñas y densas en los pacientes diabéticos (Choi and Ginsberg, 2011; Dullaart, 1995). Es de destacar que la dislipidemia que aparece en estos cuadros clínicos contribuye al riesgo de complicaciones macrovasculares (Brownlee, 2005; Chawla et al., 2016; Pyörälä et al., 1997).

Al fin de seguir investigando sobre las diferencias/similitudes que unen o diferencian a los pacientes DM1 y DM2, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha decidido explorar las dinámicas de interacción entre los leucocitos circulantes en los pacientes DM1 y las células endoteliales. Como ha sido descrito por *Hernandez-Mijares et al* (Hernandez-Mijares et al., 2013), la inflamación crónica de bajo grado presente en los DM2 se refleja con un aumento en las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF α , junto con los niveles de CRP y de la enzima MPO con respecto a una población control. De acuerdo con estos datos, en los pacientes DM1 hemos observados un aumento en los niveles de TNF α y de la actividad de la MPO, pero, por el contrario, los datos no han evidenciado ninguna diferencia significativa en los niveles de la IL-6 y de la CRP, hecho probablemente debido a que el 40,4% de los pacientes DM1 estaban bajo tratamiento con estatinas, moléculas con propiedades anti-inflamatorias además de su actividad hipolipemiente (Cherry et al., 1992; Loppnow et al., 2011). A su vez, los pacientes con DM1 no presentaron sobrepeso y obesidad, por lo que su estado se puede considerar como inflamatorio, pero en menor grado que los DM2.

Bajo esta condición de inflamación crónica y constante derivada por la respuesta inmune que caracteriza estos pacientes, en respuesta a la liberación de mediadores proinflamatorios, se promueve la producción de moléculas de adhesión celular (como las selectinas, VCAM-1 e ICAM-1) por parte de las células endoteliales (Gahmberg et al., 1998), las cuales median el proceso de la cascada de adhesión leucocitaria (marginalización a lo largo de las paredes endoteliales, adhesión y transmigración al subendotelio vascular). En este sentido, nuestra cohorte de pacientes DM1, mostró un aumento significativo en los niveles de la P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 en suero.

Con el fin de poder estudiar las dinámicas de interacción que ocurren *in vivo*, hemos utilizado un sistema *ex vivo* formado por una cámara de flujo paralelo a velocidad constante (0,3mL/min, correspondiente a la velocidad del flujo sanguíneo humano *in vivo*) conectado a un microscopio invertido dotado de un sistema con cámara de video. Para ello, se perfundieron los leucocitos aislados en suspensión y se dejaron pasar sobre una monocapa de células endoteliales humanas procedentes de vena de cordón umbilical (HUVEC del inglés human umbilical vein endothelial cells), reproduciendo de esta forma el proceso de la captura de los leucocitos por parte del

endotelio (Goetz et al., 1999). Los pacientes DM1 presentaron una menor velocidad de rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio junto a un mayor flujo de rodamiento, reflejando que en la DM1 los leucocitos tienden a frenarse cuando se acercan a las células endoteliales. En consonancia con esto, observamos mayor número de leucocitos que interactúan con el endotelio y, por lo tanto, que permanecen adheridos al mismo. El aumento de las interacciones entre los leucocitos y el endotelio vascular y el consiguiente aumento en el flujo de migración al subendotelio pueden potenciar el desarrollo de disfunción endotelial con el consecuente daño vascular, predisponiendo al desarrollo de CVDs (Weber and Noels, 2011).

En cuanto al estudio de los parámetros redox, hay que destacar que los leucocitos activados que migran en el subendotelio producen y liberan una gran cantidad de ROS aumentándose de esta manera el estado de inflamación crónica y de estrés oxidativo (Kaur et al., 2018; Mittal et al., 2014). Los pacientes DM1 estudiados presentaban un aumento en la producción de los ROS tanto totales como mitocondriales, de manera similar a lo que habíamos descrito para los pacientes DM2 (Hernandez-Mijares et al., 2013; Rovira-Llopis et al., 2013; Shurtz-Swirski et al., 2001). Sin embargo, hecho observado un resultado diferencial ya que mientras en los leucocitos aislados en pacientes DM2 se ha observado un descenso en el potencial de membrana (Hernandez-Mijares et al., 2013), en el estudio de DM1 hemos observado un aumento del potencial de membrana. En este sentido, Wiederkehr et al (Wiederkehr and Wollheim, 2008) han descrito que en las células β -pancreáticas tras el aumento de los niveles de glucosa se desarrolla una hiperpolarización en la membrana mitocondrial interna, debido a un aumento de la oxidación de la glucosa misma y un aumento del consumo de ATP (Bokvist et al., 1991; Wiederkehr and Wollheim, 2008).

Aunque en la DM2 la relación entre la activación de leucocitos, expresión de moléculas de adhesión, ROS y riesgo de CVDs ha sido estudiada en detalle, por el contrario se sabe muy poco sobre esta relación en los pacientes DM1 (Blüher et al., 2002; Hernandez-Mijares et al., 2013; Mazzone et al., 2008). En este sentido, la hiperglicemia podría ser el factor clave que une en gran medida esta secuencia de acontecimientos, aunque no se conocen con precisión los mecanismos a través de los

cuales podría estar actuando. A tal fin, hemos explorado en los pacientes DM1 las posibles correlaciones entre la hiperglicemia y los parámetros anteriormente mencionados. Los resultados nos han indicado que los niveles de glucosa en suero y la A_{1C} estaban correlacionados de forma negativa con la velocidad de rodamiento y de forma positiva con el número de células que se adhieren al endotelio y con las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1. A su vez VCAM-1 se correlacionaba con la IL-6. Además, la A_{1C} se correlacionó de forma positiva con el flujo de rodamiento y con el TNF α , subrayando de esta manera el importante papel jugado por el control glicémico en el desarrollo de las primeras fases del proceso aterosclerótico.

También, hemos observado una correlación positiva entre los niveles de TNF α y el potencial de membrana, el flujo de rodamiento y los niveles de MPO. Todos estos datos apuntan a que el estado glicémico puede estar modulando la inflamación, y que el TNF α pudiera potenciar el aumento del potencial de membrana (Simpson and Ferguson, 2017). La MPO además se correlacionó positivamente con la CRP, y es de destacar que, bajo condiciones de un proceso inflamatorio, la IL-6 puede estimular el hígado a producir la CRP (Yasojima et al., 2001), y que la CRP a su vez estimula la liberación de MPO por parte de los leucocitos promoviendo el estado inflamatorio (Singh et al., 2009) pudiendo contribuir por tanto, a la oxidación de los lípidos (Hazen et al., 1999; Singh et al., 2008). Es de destacar que ambas, MPO y CRP son utilizadas como marcadores de riesgo de CVDs y de evolución de la placa aterosclerótica (Hernandez-Mijares et al., 2013; Kimak et al., 2018; Scharnagl et al., 2014).

Por último, observamos una correlación negativa entre los niveles de ROS totales y la velocidad de rodamiento. Este hecho, es muy importante ya que los ROS fomentan la adhesión leucocitaria y promueven la disfunción endotelial mediante la inactivación del NO y la activación de NF- κ B, como se ha explicado anteriormente (Apostolova et al., 2014; Ghosh et al., 1998; Montero et al., 2014).

Como conclusión de este bloque de resultados, podemos decir que al igual que lo observado con anterioridad por nuestro grupo en la DM2, también en la DM1 se observa un estado caracterizado por estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y alteraciones de las interacciones leucocito-endotelio las cuales participan en el

aumento del riesgo de desarrollar CVDs y sus complicaciones, aunque los mecanismos a través de los cuales actúan estos factores necesita estudios más profundos.

En un segundo estudio realizado, hemos profundizado sobre dos factores fundamentales que varían según los hábitos y medicación de los pacientes: los niveles de glucosa y el control glucémico. En particular hemos estudiado el papel jugado por estos dos factores sobre la respuesta inflamatoria que subyace a la DM2, poniendo la atención en la activación del complejo del inflamasoma NLRP3. El inflamasoma NLRP3 no sólo es de los mayores factores involucrados en la respuesta inflamatoria y en la disfunción mitocondrial, sino que en la última década ha sido considerado como una importante diana terapéutica en las enfermedades inflamatorias y CVDs (Bando et al., 2015; Coll et al., 2015; De Nardo and Latz, 2011; Rovira-Llopis et al., 2018).

En estudios previos hemos observado que el control glucémico juega un papel importante en la producción de ROS (Rovira-Llopis et al., 2014), y que a peor control glucémico correspondía una mayor liberación de ROS, tanto totales como mitocondriales generándose estrés oxidativo. En el presente estudio hemos corroborado este hecho, y, por lo tanto, que la hiperglucemia puede perturbar la homeostasis del sistema redox celular. Además, para el desarrollo de este objetivo hemos dividido nuestra población de estudio en dos grupos según los valores de A_{1c}: un grupo con A_{1c} ≤ 7% y uno con A_{1c} ≥ 8%. Hemos decidido excluir en la segunda fase de análisis los sujetos que presentaban valores de A_{1c} entre 7 y 8%, siendo este intervalo peculiar en el sentido de las diferencias inter-individuales entre los pacientes además de que teníamos un número reducido de pacientes. Los datos obtenidos mostraron que no había diferencias significativas en los niveles de ROS totales entre los dos grupos de pacientes. A nivel mitocondrial, observamos niveles de ROS más altos en los dos grupos con respecto al grupo control, aumentando dicha diferencia de manera más significativa en el grupo con peor control glucémico. Además, observamos que existía entre los dos grupos de pacientes diferencias significativas en la producción de ROS mitocondriales, sugiriendo que el control glucémico puede afectar el correcto funcionamiento de la mitocondria y su estado redox. (UKPDS Group, 1998a, 1998b).

En los estudios que se emplean para evaluar la activación del inflamasoma NLRP3, hemos observado datos contradictorios en relación a lo descrito en la bibliografía en otros tipos celulares. Este hecho probablemente es debido a que muchos estudios evalúan los niveles de las interleuquinas y/o la activación del complejo NLRP3 induciendo/inhibiendo su expresión/activación empleando tratamientos o sustancias que activan esta ruta, como por ejemplo ácidos grasos y palmitato (Shirasuna et al., 2016; Snodgrass et al., 2013). En nuestro estudio hemos estudiado los leucocitos procedentes de pacientes DM2 sin tratarlos, de manera que los datos obtenidos reflejaban lo que estaba pasando en el organismo del paciente sin posibilidad de modificación de los efectos de la respuesta inflamatoria por interferencias por parte de tratamientos externos. Nuestros datos indicaban una disminución en la expresión de mRNA y de proteína NLRP3, acentuándose este descenso de forma muy significativa en los pacientes con un peor control glicémico, sugiriendo la presencia de alteraciones en la respuesta inflamatoria en los leucocitos de estos pacientes.

A su vez, también hemos obtenido una disminución significativa en los niveles de expresión del mRNA de la caspasa-1 en el grupo de pacientes con mal control glucémico frente al grupo control. Al dividir la población por grupos, obtuvimos que en los pacientes bien controlados esta diferencia se perdía, y los niveles de expresión de la caspasa-1 se presentaban similares a lo del grupo control, pero, por el contrario, en el grupo con mal control glucémico la expresión de la caspasa-1 disminuía más, en acuerdo con la bajada de la expresión del inflamasoma NLRP3 (Kousathana et al., 2017).

Analizando el cuadro inflamatorio, observamos que la expresión de la IL-1 β tanto en suero como a nivel de mRNA disminuía a medida que empeoraba el control glucémico. En relación a la expresión de la IL-12 en suero y en la expresión a nivel de mRNA en la IL-18, hemos observado que este patrón se mantiene, es decir un descenso, aunque en la IL-18 la bajada no era estadísticamente significativa, probablemente debido al número reducido de participantes en el estudio. En apoyo a nuestra hipótesis, nuestros resultados son parecidos a lo que han obtenido *Kousathana et al* (Kousathana et al., 2017), los cuales observaron en los monocitos aislados de pacientes DM2 con mal control glucémico una alterada activación del inflamasoma NLRP3, la cual es causa de defectos de producción de la IL-1 β y un

aumento de la interleuquina IL-6, pudiéndose explicar de esta manera por qué estos pacientes tienen tendencia a desarrollar con más facilidad infecciones. Además de la hipótesis de la desregulación de la respuesta inmune, hemos observado una disminución en los niveles de IL-12 en suero, citoquina que está implicada en la activación de los linfocito T helper 1 (Trinchieri, 2003); así como de la interleuquina IL-18, que ha demostrado estar relacionada con el desarrollo de obesidad e IR en modelos murinos (Netea et al., 2006).

Estos resultados, podrían explicar el aumento de ROS, la disminución de la activación de NLRP3 y el papel del control glucémico. Sin embargo, se ha demostrado que los ROS son uno de los factores implicados en la activación del inflammasoma NLRP3, como se ha descrito anteriormente en la presente tesis. Dicho aumento podría estar activando el complejo del inflammasoma NLRP3, aunque en nuestro estudio, no hemos observado tal efecto. Es por ello, que futuros experimentos tendrán en cuenta los posibles cambios a nivel de los complejos mitocondriales y otros mecanismos moleculares que están afectados en la DM2, así como su relación con la activación o no del inflammasoma NLRP3.

Con respecto a los resultados que han mostrado una disminución en la expresión proteica de la caspasa-1, se ha descrito que el descenso de los niveles de IL-1 β y la dieta pueden modular la acción del complejo del inflammasoma NLRP3 (Kousathana et al., 2017; Traba et al., 2017, 2015; Youm et al., 2015) mediante la sirtuina-3, la cual actuaría sobre la activación de la caspasa-1. Además, la deficiencia de la caspasa-1 se ha visto que puede predisponer a la obesidad (Kimura et al., 2016), y en la bibliografía también se ha descrito que en el tejido adiposo visceral (VAT, del inglés visceral adipose tissue) de sujetos obesos, está más asociado a disfunciones metabólicas con respecto al tejido adiposo subcutáneo (del SAT inglés subcutaneous adipose tissue) (Esser et al., 2013). De hecho, en el VAT se producen una gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias y se ha constatado que los componentes del complejo NLRP3 son más abundantes que en el SAT (Koenen et al., 2011), aunque la cantidad de mediadores producida y el grado de activación del complejo del inflammasoma varía según que estos sujetos sean metabólicamente sanos o estén afectados por desórdenes metabólicos (Esser et al., 2013).

En conclusión, el control glucémico estaría jugando un papel clave en la activación del inflamasoma NLRP3 y, por lo tanto, en la activación del sistema inmune de los pacientes con DM2. A pesar de los avances de la presente tesis doctoral, se necesita profundizar los estudios explorando los mecanismos moleculares relacionados con estas rutas.

Por último, en el tercer estudio realizado durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, hemos decidido explorar los efectos a nivel molecular del iSGLT2 empagliflozina en los pacientes con DM2. La elección de dicho fármaco se debe a las evidencias presentes en la literatura sobre su papel protector a nivel cardiovascular en los pacientes con DM2 (EMPA-REG), así como en su comparativa con otros fármacos empleados en la terapia de la DM2, como metformina, sulfonilureas, inhibidores-DPP4 etc., a pesar de que la mayoría de las evidencias proceden de modelos animales (Oelze et al., 2014; Osorio et al., 2012; Shin et al., 2016). Es más, hasta la fecha existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos moleculares modulados por dichos fármacos en cuanto a sus posibles efectos sobre los leucocitos. En nuestro estudio hemos evaluado una cohorte de pacientes con DM2 los cuales fueron tratados con el iSGLT-2 empagliflozina. De estos pacientes se evaluaron los parámetros antropométricos y bioquímicos en una situación basal, es decir en el momento de su reclutamiento, de esta manera teníamos los valores de referencia; y a los 3 y 6 meses del tratamiento. A su vez, se evaluó el estrés oxidativo así como un panel de citoquinas entre las cuales se incluía IL-6, TNF α , IL-10 y mediadores pro- y anti-inflamatorios (hs-CRP y MPO).

Los resultados mostraron una disminución significativa en el peso de los pacientes a los 3 y a los 6 meses tras tratamiento, junto a una marcada reducción en el perímetro de la cintura, probablemente ambos debidos al efecto diurético del tratamiento (Sattar et al., 2017). En este estudio, no hemos observado diferencias en las presiones arterial sistólica y diastólica, probablemente por el tiempo de estudio, a diferencia de lo que está descrito por otros estudios (Hattori, 2018). Con respecto al perfil lipídico, observamos un aumento en los niveles de colesterol total a los 3 meses de tratamiento, que se veía revertido a los 6 meses, aunque presentando un valor ligeramente mayor que en el tiempo basal, como también ha sido descrito en otros estudios (Häring et al., 2014; Monami et al., 2014). Este patrón lo hemos encontrado

también en los niveles de triglicéridos y en los niveles de LDL-c; por el contrario, los niveles de HDL-c presentaban una tendencia a bajar a los 3 meses y a subir más del valor basal a los 6 meses, aunque el aumento observado no era significativo. Evaluando el índice HOMA-IR y la insulina, los datos mostraron una tendencia a bajar tras el tratamiento, sin llegar a la significación, mostrando de nuevo un papel beneficioso de la empagliflozina en el tratamiento de la DM2.

Los datos que se refieren a los mecanismos moleculares que intervienen en la DM2, hemos observado un descenso en la producción de ROS mitocondriales, indicando una disminución de estrés oxidativo. Además, observamos un aumento significativo en los niveles de GSH a los 3 y 6 meses del tratamiento, aunque no encontramos cambios significativos al evaluar la carbonilación de las proteínas. Estudiando la expresión génica de los principales antioxidantes, los datos mostraron en consonancia con los resultados obtenidos por el GSH, un aumento significativo en la expresión de la enzima glutatión S reductasa (GSR). Además, observamos un aumento en la expresión de la enzima catalasa (CAT), la cual aumentaba a los 3 meses alcanzando la significación a los 6 meses. De acuerdo con los resultados obtenidos en los modelos animales (Li et al., 2019; Osorio et al., 2012; Shin et al., 2016; Sugizaki et al., 2017) y en algunos estudios conducidos en pacientes DM2 y cultivos celulares en humanos (Das et al., 2020; Nishimura et al., 2015), nuestros resultados destacan que la empagliflozina está reduciendo el estrés oxidativo, y por lo tanto contribuyendo a restaurar la homeostasis entre factores pro- y anti-oxidantes en los leucocitos de pacientes con DM2.

Es de destacar que el riñón es un órgano muy susceptible al daño oxidativo producido por la hiperglucemia. Además, el proceso de captación de glucosa por parte de las células mesangiales y tubulares no está controlado por la insulina, y sí por la concentración de la glucosa misma. Este hecho hace que bajo condiciones de hiperglucemia crónica se produzca una gran cantidad de ROS, causando daños funcionales y estructurales en las células, aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades tales como la nefropatía diabética (Singh et al., 2011), enfermedad de muy alta prevalencia en la DM2.

Teniendo en cuenta que desde estos primeros resultados fue bastante evidente que el tratamiento con la empagliflozina empezaba a manifestar sus efectos beneficiosos

después de 6 meses, nos hemos centrado principalmente en este tiempo de estudio. En este sentido, y al evaluar los marcadores inflamatorios observamos un descenso en los marcadores pro-inflamatorios CRP y MPO, y un aumento en la IL-10, citoquina anti-inflamatoria. Estos resultados están en línea con el efecto cardioprotector y anti-inflamatorio que ejerce la empagliflozina, teniendo en cuenta que la CRP y MPO se correlacionan con el daño endotelial y con la formación y ruptura de la placa aterosclerótica que subyacen a las CVDs (Anatoliotakis et al., 2013; Bosch et al., 2005; Teng et al., 2017). En apoyo a estos resultados, en la bibliografía hay muchos estudios que demuestran que los iSGLT2 pueden preservar a las células endoteliales vasculares de daños debidos a la hiperglucemia en modelos animales (El-Daly et al., 2018; Steven et al., 2017).

Por último, todos estos resultados sugieren que la empagliflozina previene la aparición de estrés oxidativo actuando sobre el equilibrio redox entre los factores pro- y anti oxidantes, modulando en consecuencia la inflamación subyacente a la DM2 y el riesgo de CVDs, aunque los mecanismos a través de los cuales este fármaco estaría actuando se conocen solo en parte. Un primer mecanismo de prevención en las CVDs podría ser el hecho de la reducción del peso corporal, al cual se acompaña una reducción del tejido adiposo, el cual, como se ha comentado anteriormente en la presente tesis, es un gran generador de mediadores inflamatorios; la bajada de peso junto a la reducción en la presiones sistólica y diastólica descrita en la literatura contribuye sin duda a la prevención de los daños en las paredes vasculares; el incremento de las defensas antioxidantes puede contribuir a la protección de las células cardiacas de los daños causados por el estrés oxidativo.

Todos estos resultados apuntan a que los iSGLT2 y, entre ellos, la empagliflozina, puedan ser considerados como fármacos con una alta prevención del riesgo de CVDs en la DM2 y otras enfermedades correlacionadas como la obesidad. En este sentido, hay un estudio muy importante, el EMPA-REG OUTCOME (Pham and Chilton, 2017; Zinman et al., 2015), donde se ha demostrado una reducción del 38% en la mortalidad en sujetos diabéticos y con alto riesgo cardiovascular tratados con empagliflozina. En este estudio de alrededor de 3 años, se reclutaron 7020 pacientes con DM2 que tomaron empagliflozina 10 mg, 25 mg o una dosis de 'placebo una vez al día. Los resultados demostraron que tras el tratamiento con empagliflozina había

una reducción en términos de peso, de PAS y de riesgo cardiovascular total, junto a cambios en la elasticidad de las paredes arteriales y mejora en la función cardíaca (efecto cardioprotector); además disminuyeron los niveles de albumina y del ácido úrico (efecto renoprotector) (Ferrannini et al., 2016; Munir and Davis, 2016; Sattar et al., 2016; Vettor et al., 2017; Zinman et al., 2015). Queda pendiente todavía por aclarar los mecanismos moleculares involucrados en este efecto beneficioso sobre la modulación del estrés oxidativo y de la inflamación generalizada. Por otro lado, el efecto combinado de la terapia con iSGLT2 con otros fármacos, ya que dicha combinación, como en el caso de los inhibidores-DPP4 (Birnbaum et al., 2018) podría prevenir también otras comorbilidades de la DM2.

Hay que tener en cuenta que nuestro estudio tiene varias limitaciones: una es el número de los pacientes reclutados, y otra es el limitado tiempo de seguimiento. A tal fin, nos proponemos ampliar este estudio.

4. CONCLUSIONS

1. Enhanced leukocyte-endothelium interaction, oxidative stress and mitochondrial dysfunction are features present in the leukocytes of DM1 patients, and they are correlated with glucose and A_{1C} levels, increased cytokine and pro-inflammatory mediators, like TNF α and MPO, and expression of endothelial adhesion molecule. These findings indicate that oxidative stress and mitochondrial dysfunction promote leukocyte-endothelium interactions in T1D and can be correlated to the development of CVDs.

2. There is an increase in total mitochondrial ROS production, an impairment in NLRP3 inflammasome activation, decrease in IL-1 β , IL-12 and caspase-1 levels in response to glycemic control and in with A_{1C} levels, which is more evident in patient with poor poorly controlled patients. These results suggest that in DM2 patients glycemic control is essential for inflammasome activation and a correct immune response, explaining why this patients are more prone to infection.

3. Empagliflozin treatment decrease glucose and A_{1C} levels and ameliorate oxidative stress and inflammation by decrease mitochondrial ROS production, increase antioxidant defense in leukocyte from DM2 patients after 24-week treatment. Concomitantly empagliflozin treatment ameliorate inflammation by decreasing CRP and MPO levels and increasing IL-10 levels. All together these findings demonstrate that empagliflozin not only prevent hyperglycemia but also protect against ROS injury decreasing risk of CVDs.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani, M.A., DeFronzo, R.A., 2008. Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 14, 782–790. <https://doi.org/10.4158/EP.14.6.782>
- Abdul-Ghani, M.A., Norton, L., DeFronzo, R.A., 2011. Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 32, 515–531. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0029>
- Ahmad, R., Thomas, R., Kochumon, S., Sindhu, S., 2017. Increased adipose tissue expression of IL-18R and its ligand IL-18 associates with inflammation and insulin resistance in obesity. *Immun. Inflamm. Dis.* 5, 318–335. <https://doi.org/10.1002/iid3.170>
- Ahn, B.-H., Kim, H.-S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.-X., Finkel, T., 2008. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14447–14452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803790105>
- al Sakkaf, L., Pozzilli, P., Bingley, P.J., Lowdell, M.W., Thomas, J.M., Bonifacio, E., Gale, E.A., Bottazzo, G.F., 1992. Early T-cell defects in pre-type 1 diabetes. *Acta Diabetol.* 28, 189–192. <https://doi.org/10.1007/BF00778996>
- Alberti, K.G., Zimmet, P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 15, 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Alom-Ruiz, S.P., Anilkumar, N., Shah, A.M., 2008. Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1089–1100. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.2007>
- Alsahli, M., Gerich, J.E., 2017. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 133, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.033>
- American Diabetes Association, 2013. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care* 36 Suppl 1, S11-66. <https://doi.org/10.2337/dc13-S011>
- Anand, U., Anand, C.V., 2012. Myeloperoxidase: a new twist to an old tale. *Indian J. Clin. Biochem. IJCB* 27, 107–109. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0220-0>
- Anatoliotakis, N., Deftereos, S., Bouras, G., Giannopoulos, G., Tsounis, D., Angelidis, C., Kaoukis, A., Stefanadis, C., 2013. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 115–138. <https://doi.org/10.2174/1568026611313020004>
- Anders, H.-J., Davis, J.M., Thurau, K., 2016. Nephron Protection in Diabetic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2096–2098. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1608564>
- Apostolova, N., Rocha, M., Rovira-Llopis, S., Banuls, C., Falcon, R., Castello, R., Hernandez-Mijares, A., Victor, V.M., 2014. Mitochondria-targeted antioxidants as a

therapeutic strategy for protecting endothelium in cardiovascular diseases. *Curr. Med. Chem.* 21, 2989–3006. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140601200416>

Apovian, C.M., 2016. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am. J. Manag. Care* 22, s176-185.

Apovian, C.M., Aronne, L.J., 2015. The 2013 American Heart Association/American College of Cardiology/The Obesity Society Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults: What Is New About Diet, Drugs, and Surgery for Obesity? *Circulation* 132, 1586–1591. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010772>

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michels, A.W., 2014. Type 1 diabetes. *Lancet Lond. Engl.* 383, 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)

Bach, J.F., 1994. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15, 516–542. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-4-516>

Badimon, L., Vilahur, G., 2014. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* 276, 618–632. <https://doi.org/10.1111/joim.12296>

Balducci, S., Iacobellis, G., Parisi, L., Di Biase, N., Calandriello, E., Leonetti, F., Fallucca, F., 2006. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J. Diabetes Complications* 20, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2005.07.005>

Bando, S., Fukuda, D., Soeki, T., Nishimoto, S., Uematsu, E., Matsuura, T., Ise, T., Tobiume, T., Yamaguchi, K., Yagi, S., Iwase, T., Yamada, H., Wakatsuki, T., Shimabukuro, M., Sata, M., 2015. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 242, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.043>

Bandyopadhyay, S., Lane, T., Venugopal, R., Parthasarathy, P.T., Cho, Y., Galam, L., Lockey, R., Kolliputi, N., 2013. MicroRNA-133a-1 regulates inflammasome activation through uncoupling protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439, 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.056>

Barnard, R.J., Ugianskis, E.J., Martin, D.A., Inkeles, S.B., 1992. Role of diet and exercise in the management of hyperinsulinemia and associated atherosclerotic risk factors. *Am. J. Cardiol.* 69, 440–444. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(92\)90981-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(92)90981-4)

Barrett, M.P., Walmsley, A.R., Gould, G.W., 1999. Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 496–502. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)80072-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80072-6)

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>

Bause, A.S., Haigis, M.C., 2013. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 48, 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.08.007>

- Beckman, J.A., Goldfine, A.B., Gordon, M.B., Garrett, L.A., Creager, M.A., 2002. Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ. Res.* 90, 107–111. <https://doi.org/10.1161/hh0102.102359>
- Bhupathiraju, S.N., Hu, F.B., 2016. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ. Res.* 118, 1723–1735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306825>
- Bingley, P.J., 2010. Clinical applications of diabetes antibody testing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 25–33. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1365>
- Birnbaum, Y., Bajaj, M., Yang, H.-C., Ye, Y., 2018. Combined SGLT2 and DPP4 Inhibition Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Nephropathy in Mice with Type 2 Diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 32, 135–145. <https://doi.org/10.1007/s10557-018-6778-x>
- Blüher, M., Unger, R., Rassoul, F., Richter, V., Paschke, R., 2002. Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes. *Diabetologia* 45, 210–216. <https://doi.org/10.1007/s00125-001-0723-3>
- Bokvist, K., Ammälä, C., Ashcroft, F.M., Berggren, P.O., Larsson, O., Rorsman, P., 1991. Separate processes mediate nucleotide-induced inhibition and stimulation of the ATP-regulated K(+) channels in mouse pancreatic beta-cells. *Proc. Biol. Sci.* 243, 139–144. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0022>
- Bonner, C., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Queniat, G., Moerman, E., Thévenet, J., Beaucamps, C., Delalleau, N., Popescu, I., Malaisse, W.J., Sener, A., Deprez, B., Abderrahmani, A., Staels, B., Pattou, F., 2015. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat. Med.* 21, 512–517. <https://doi.org/10.1038/nm.3828>
- Borggreve, S.E., De Vries, R., Dullaart, R.P.F., 2003. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 1051–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2003.01263.x>
- Bosch, M., Lopez-Bermejo, A., Vendrell, J., Musri, M., Ricart, W., Fernandez-Real, J.-M., 2005. Circulating IL-18 concentration is associated with insulin sensitivity and glucose tolerance through increased fat-free mass. *Diabetologia* 48, 1841–1843. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1859-3>
- Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R., 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Boustany, C.M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D.R., Randall, D.C., Cassis, L.A., 2004. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-

induced obesity and hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R943-949. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00265.2004>

Brown, A., Guess, N., Dornhorst, A., Taheri, S., Frost, G., 2017. Insulin-associated weight gain in obese type 2 diabetes mellitus patients: What can be done? *Diabetes Obes. Metab.* 19, 1655–1668. <https://doi.org/10.1111/dom.13009>

Brown, D.I., Griendling, K.K., 2015. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 116, 531–549. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303584>

Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615–1625. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>

Burgos-Morón, E., Abad-Jiménez, Z., Marañón, A.M. de, Iannantuoni, F., Escribano-López, I., López-Domènech, S., Salom, C., Jover, A., Mora, V., Roldan, I., Solá, E., Rocha, M., Víctor, V.M., 2019. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J. Clin. Med.* 8. <https://doi.org/10.3390/jcm8091385>

Butterfield, W.J., Keen, H., Whichelow, M.J., 1967. Renal glucose threshold variations with age. *Br. Med. J.* 4, 505–507. <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5578.505>

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., Shoelson, S.E., 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* 11, 183–190. <https://doi.org/10.1038/nm1166>

Caputo, M., Cerrone, G.E., Lopez, A.P., Gonzalez, C., Mazza, C., Cedola, N., Puchulu, F.M., Targovnik, H.M., Frechtel, G.D., 2005. [HLA DQB1 genotyping in latent autoimmune diabetes of adults (LADA)]. *Medicina (Mex.)* 65, 235–240.

Cárcamo, J.M., Pedraza, A., Bórquez-Ojeda, O., Zhang, B., Sanchez, R., Golde, D.W., 2004. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits IkappaBalpha kinase beta. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6645–6652. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.15.6645-6652.2004>

Carnagarin, R., Dharmarajan, A.M., Dass, C.R., 2015. Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle--A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 417, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.004>

Carrizzo, A., Izzo, C., Oliveti, M., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Di Pietro, P., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., Frati, G., Migliarino, S., Damato, A., Ambrosio, M., De Caro, F., Vecchione, C., 2018. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19102968>

Cave, A.C., Brewer, A.C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D.J., Walker, S., Shah, A.M., 2006. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 691–728. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.691>

Chawla, A., Chawla, R., Jaggi, S., 2016. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J. Endocrinol. Metab.* 20, 546–551. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.183480>

- Cheng, X., Siow, R.C.M., Mann, G.E., 2011. Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: a role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 469–487. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3283>
- Cherry, J.A., Tobet, S.A., DeVogd, T.J., Baum, M.J., 1992. Effects of sex and androgen treatment on dendritic dimensions of neurons in the sexually dimorphic preoptic/anterior hypothalamic area of male and female ferrets. *J. Comp. Neurol.* 323, 577–585. <https://doi.org/10.1002/cne.903230410>
- Cho, K.W., Lee, O.-H., Banz, W.J., Moustaid-Moussa, N., Shay, N.F., Kim, Y.-C., 2010. Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPARgamma transcriptional activity. *J. Nutr. Biochem.* 21, 841–847. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.012>
- Choi, S.H., Ginsberg, H.N., 2011. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 22, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.04.007>
- Christoffersson, G., Rodriguez-Calvo, T., von Herrath, M., 2016. Recent advances in understanding Type 1 Diabetes. *F1000Research* 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7356.1>
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., Eizirik, D.L., 2005. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97-107. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.s97
- Coelho, M., Oliveira, T., Fernandes, R., 2013. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci. AMS* 9, 191–200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- Coll, R.C., Robertson, A.A.B., Chae, J.J., Higgins, S.C., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M.C., Vetter, I., Dungan, L.S., Monks, B.G., Stutz, A., Croker, D.E., Butler, M.S., Haneklaus, M., Sutton, C.E., Núñez, G., Latz, E., Kastner, D.L., Mills, K.H.G., Masters, S.L., Schroder, K., Cooper, M.A., O'Neill, L.A.J., 2015. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21, 248–255. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>
- Cook-Mills, J.M., Marchese, M.E., Abdala-Valencia, H., 2011. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1607–1638. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3522>
- Coughlan, M.T., Thorburn, D.R., Penfold, S.A., Laskowski, A., Harcourt, B.E., Sourris, K.C., Tan, A.L.Y., Fukami, K., Thallas-Bonke, V., Nawroth, P.P., Brownlee, M., Bierhaus, A., Cooper, M.E., Forbes, J.M., 2009. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 742–752. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050514>
- Coughlan, M.T., Yap, F.Y.T., Tong, D.C.K., Andrikopoulos, S., Gasser, A., Thallas-Bonke, V., Webster, D.E., Miyazaki, J.-I., Kay, T.W., Slattery, R.M., Kaye, D.M., Drew, B.G., Kingwell, B.A., Fourlanos, S., Groop, P.-H., Harrison, L.C., Knip, M., Forbes, J.M., 2011.

- Advanced glycation end products are direct modulators of β -cell function. *Diabetes* 60, 2523–2532. <https://doi.org/10.2337/db10-1033>
- Dansky, H.M., Barlow, C.B., Lominska, C., Sikes, J.L., Kao, C., Weinsaft, J., Cybulsky, M.I., Smith, J.D., 2001. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1662–1667. <https://doi.org/10.1161/hq1001.096625>
- Das, N.A., Carpenter, A.J., Belenchia, A., Aroor, A.R., Noda, M., Siebenlist, U., Chandrasekar, B., DeMarco, V.G., 2020. Empagliflozin reduces high glucose-induced oxidative stress and miR-21-dependent TRAF3IP2 induction and RECK suppression, and inhibits human renal proximal tubular epithelial cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell. Signal.* 68, 109506. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109506>
- de Ferranti, S.D., de Boer, I.H., Fonseca, V., Fox, C.S., Golden, S.H., Lavie, C.J., Magge, S.N., Marx, N., McGuire, D.K., Orchard, T.J., Zinman, B., Eckel, R.H., 2014. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 37, 2843–2863. <https://doi.org/10.2337/dc14-1720>
- de Graaff, L.C.G., Smit, J.W.A., Radder, J.K., 2007. Prevalence and clinical significance of organ-specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. *Neth. J. Med.* 65, 235–247.
- De Nardo, D., Latz, E., 2011. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 32, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.004>
- DeFronzo, R.A., 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 88, 787–835, ix. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.04.013>
- D'Espessailles, A., Mora, Y.A., Fuentes, C., Cifuentes, M., 2018. Calcium-sensing receptor activates the NLRP3 inflammasome in LS14 preadipocytes mediated by ERK1/2 signaling. *J. Cell. Physiol.* 233, 6232–6240. <https://doi.org/10.1002/jcp.26490>
- Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Donath, M.Y., Shoelson, S.E., 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 98–107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>
- Doyle, M.E., Egan, J.M., 2007. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol. Ther.* 113, 546–593. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.11.007>
- Drechsler, M., Duchene, J., Soehnlein, O., 2015. Chemokines control mobilization, recruitment, and fate of monocytes in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1050–1055. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304649>
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

- Dullaart, R.P., 1995. Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Neth. J. Med.* 46, 44–54. [https://doi.org/10.1016/0300-2977\(94\)00048-e](https://doi.org/10.1016/0300-2977(94)00048-e)
- Eissele, R., Göke, R., Willemer, S., Harthus, H.P., Vermeer, H., Arnold, R., Göke, B., 1992. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 283–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1992.tb01464.x>
- Eizirik, D.L., Colli, M.L., Ortis, F., 2009. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 219–226. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.21>
- Eizirik, D.L., Mandrup-Poulsen, T., 2001. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44, 2115–2133. <https://doi.org/10.1007/s001250100021>
- El-Daly, M., Pulakazhi Venu, V.K., Saifeddine, M., Mihara, K., Kang, S., Fedak, P.W.M., Alston, L.A., Hirota, S.A., Ding, H., Triggle, C.R., Hollenberg, M.D., 2018. Hyperglycaemic impairment of PAR2-mediated vasodilation: Prevention by inhibition of aortic endothelial sodium-glucose-co-Transporter-2 and minimizing oxidative stress. *Vascul. Pharmacol.* 109, 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.06.006>
- Elston, T., Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391, 510–513. <https://doi.org/10.1038/35185>
- Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Pennells, L., Wood, A.M., White, I.R., Gao, P., Walker, M., Thompson, A., Sarwar, N., Caslake, M., Butterworth, A.S., Amouyel, P., Assmann, G., Bakker, S.J.L., Barr, E.L.M., Barrett-Connor, E., Benjamin, E.J., Björkelund, C., Brenner, H., Brunner, E., Clarke, R., Cooper, J.A., Cremer, P., Cushman, M., Dagenais, G.R., D'Agostino, R.B., Dankner, R., Davey-Smith, G., Deeg, D., Dekker, J.M., Engström, G., Folsom, A.R., Fowkes, F.G.R., Gallacher, J., Gaziano, J.M., Giampaoli, S., Gillum, R.F., Hofman, A., Howard, B.V., Ingelsson, E., Iso, H., Jørgensen, T., Kiechl, S., Kitamura, A., Kiyohara, Y., Koenig, W., Kromhout, D., Kuller, L.H., Lawlor, D.A., Meade, T.W., Nissinen, A., Nordestgaard, B.G., Onat, A., Panagiotakos, D.B., Psaty, B.M., Rodriguez, B., Rosengren, A., Salomaa, V., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Shaffer, J.A., Shea, S., Ford, I., Stehouwer, C.D.A., Strandberg, T.E., Tipping, R.W., Tosetto, A., Wassertheil-Smoller, S., Wennberg, P., Westendorp, R.G., Whincup, P.H., Wilhelmsen, L., Woodward, M., Lowe, G.D.O., Wareham, N.J., Khaw, K.-T., Sattar, N., Packard, C.J., Gudnason, V., Ridker, P.M., Pepys, M.B., Thompson, S.G., Danesh, J., 2012. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N. Engl. J. Med.* 367, 1310–1320. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107477>
- Engin, A., 2017. Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 960, 135–160. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_6
- Esser, N., L'homme, L., De Roover, A., Kohonen, L., Scheen, A.J., Moutschen, M., Piette, J., Legrand-Poels, S., Paquot, N., 2013. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* 56, 2487–2497. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3023-9>

- Esteban-Jiménez, O., Navarro-Pemán, C., Urieta-González, L., 2018. [Safety of SGLT2 inhibitors. A review of the adverse drug reactions registered in a national database]. *Semergen* 44, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2017.10.003>
- Ferrannini, E., Mark, M., Mayoux, E., 2016. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: A “Thrifty Substrate” Hypothesis. *Diabetes Care* 39, 1108–1114. <https://doi.org/10.2337/dc16-0330>
- Ferrannini, E., Muscelli, E., Frascerra, S., Baldi, S., Mari, A., Heise, T., Broedl, U.C., Woerle, H.-J., 2014. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 124, 499–508. <https://doi.org/10.1172/JCI72227>
- Ferrannini, G., Hach, T., Crowe, S., Sanghvi, A., Hall, K.D., Ferrannini, E., 2015. Energy Balance After Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition. *Diabetes Care* 38, 1730–1735. <https://doi.org/10.2337/dc15-0355>
- Fineberg, S.E., Biegel, A.A., Durr, K.L., Hufferd, S., Fineberg, N.S., Anderson, J.H., 1991. Presence of insulin autoantibodies as regular feature of nondiabetic repertoire of immunity. *Diabetes* 40, 1187–1193. <https://doi.org/10.2337/diab.40.9.1187>
- Freitas, H.S., Anê, G.F., Melo, K.F.S., Okamoto, M.M., Oliveira-Souza, M., Bordin, S., Machado, U.F., 2008. Na(+) -glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. *Endocrinology* 149, 717–724. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1088>
- Fullard, N., O'Reilly, S., 2015. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin. Immunopathol.* 37, 511–517. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0503-7>
- Gahmberg, C.G., Valmu, L., Fagerholm, S., Kotovuori, P., Ihanus, E., Tian, L., Pessa-Morikawa, T., 1998. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 54, 549–555. <https://doi.org/10.1007/s000180050183>
- Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Rapino, F., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., Graf, T., Hornung, V., 2016. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 44, 833–846. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>
- Gaidt, M.M., Hornung, V., 2017. Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells. *Curr. Opin. Immunol.* 44, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.007>
- Geiszt, M., Leto, T.L., 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J. Biol. Chem.* 279, 51715–51718. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400024200>
- Genuth, S., Alberti, K.G.M.M., Bennett, P., Buse, J., Defronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., Knowler, W.C., Lebovitz, H., Lernmark, A., Nathan, D., Palmer, J., Rizza, R., Saudek, C., Shaw, J., Steffes, M., Stern, M., Tuomilehto, J., Zimmet, P., Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26, 3160–3167. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.11.3160>

- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>
- Goetz, D.J., Greif, D.M., Shen, J., Luscinskas, F.W., 1999. Cell-cell adhesive interactions in an in vitro flow chamber. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 96, 137–145. <https://doi.org/10.1385/1-59259-258-9:137>
- Gray, N., Picone, G., Sloan, F., Yashkin, A., 2015. Relation between BMI and diabetes mellitus and its complications among US older adults. *South. Med. J.* 108, 29–36. <https://doi.org/10.14423/SMJ.0000000000000214>
- Greene, E.L., Nelson, B.A., Robinson, K.A., Buse, M.G., 2001. alpha-Lipoic acid prevents the development of glucose-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and accelerates the decline in immunoreactive insulin during cell incubation. *Metabolism.* 50, 1063–1069. <https://doi.org/10.1053/meta.2001.25601>
- Gurel, Z., Sheibani, N., 2018. O-Linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification: a new pathway to decode pathogenesis of diabetic retinopathy. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 132, 185–198. <https://doi.org/10.1042/CS20171454>
- Gustapane, M., Cardillo, M.T., Biasillo, G., Biasucci, L.M., 2011. [Myeloperoxidase as possible diagnostic and prognostic marker of acute coronary syndrome]. *Recenti Prog. Med.* 102, 447–450. <https://doi.org/10.1701/975.10611>
- Guzik, T.J., West, N.E.J., Pillai, R., Taggart, D.P., Channon, K.M., 2002. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 39, 1088–1094. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000018041.48432.b5>
- Hadi, H.A.R., Carr, C.S., Al Suwaidi, J., 2005. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manag.* 1, 183–198.
- Haghighatpanah, Mohammad, Nejad, A.S.M., Haghighatpanah, Maryam, Thunga, G., Mallayasamy, S., 2018. Factors that Correlate with Poor Glycemic Control in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Complications. *Osong Public Health Res. Perspect.* 9, 167–174. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.4.05>
- Halden, T.A.S., Egeland, E.J., Åsberg, A., Hartmann, A., Midtvedt, K., Khiabani, H.Z., Holst, J.J., Knop, F.K., Hornum, M., Feldt-Rasmussen, B., Jenssen, T., 2016. GLP-1 Restores Altered Insulin and Glucagon Secretion in Posttransplantation Diabetes. *Diabetes Care* 39, 617–624. <https://doi.org/10.2337/dc15-2383>
- Haneklaus, M., O'Neill, L.A.J., 2015. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol. Rev.* 265, 53–62. <https://doi.org/10.1111/imr.12285>
- Harijith, A., Ebenezer, D.L., Natarajan, V., 2014. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front. Physiol.* 5, 352. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00352>
- Häring, H.-U., Merker, L., Seewaldt-Becker, E., Weimer, M., Meinicke, T., Broedl, U.C., Woerle, H.J., EMPA-REG MET Trial Investigators, 2014. Empagliflozin as add-on to

metformin in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 37, 1650–1659. <https://doi.org/10.2337/dc13-2105>

Hattori, S., 2018. Anti-inflammatory effects of empagliflozin in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetol. Metab. Syndr.* 10, 93. <https://doi.org/10.1186/s13098-018-0395-5>

Hayward, J.A., Mathur, A., Ngo, C., Man, S.M., 2018. Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 82. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-18>

Hazen, S.L., Zhang, R., Shen, Z., Wu, W., Podrez, E.A., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Mitra, S.N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P.A., Hoff, H.F., Abu-Soud, H.M., 1999. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. *Circ. Res.* 85, 950–958. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.10.950>

Herder, C., Illig, T., Rathmann, W., Martin, S., Haastert, B., Müller-Scholze, S., Holle, R., Thorand, B., Koenig, W., Wichmann, H.E., Kolb, H., KORA Study Group, 2005. Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen Bundesverb. Ärzte Öffentlichen Gesundheitsdienstes Ger.* 67 Suppl 1, S115-121. <https://doi.org/10.1055/s-2005-858252>

Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., Apostolova, N., Borrás, C., Jover, A., Bañuls, C., Sola, E., Victor, V.M., 2011. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.019>

Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Bellod, L., de Pablo, C., Alvarez, A., Roldan-Torres, I., Sola-Izquierdo, E., Victor, V.M., 2013. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* 36, 1695–1702. <https://doi.org/10.2337/dc12-1224>

Herr, N., Mauler, M., Bode, C., Duerschmied, D., 2015. Intravital Microscopy of Leukocyte-endothelial and Platelet-leukocyte Interactions in Mesenteric Veins in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* e53077. <https://doi.org/10.3791/53077>

Holmström, M.H., Iglesias-Gutierrez, E., Zierath, J.R., Garcia-Roves, P.M., 2012. Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E731-739. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00159.2011>

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91. <https://doi.org/10.1126/science.7678183>

Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., Willett, W.C., 2001. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med.* 345, 790–797. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010492>

- Hu, G., Jousilahti, P., Qiao, Q., Peltonen, M., Katoh, S., Tuomilehto, J., 2005. The gender-specific impact of diabetes and myocardial infarction at baseline and during follow-up on mortality from all causes and coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 1413–1418. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.01.039>
- Imam, A., Hoyos, B., Swenson, C., Levi, E., Chua, R., Viriya, E., Hammerling, U., 2001. Retinoids as ligands and coactivators of protein kinase C alpha. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 28–30. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0329fje>
- Incalza, M.A., D’Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., Giorgino, F., 2018. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.* 100, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H.Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., Nawata, H., 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49, 1939–1945. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1939>
- Ivanova, E.A., Myasoedova, V.A., Melnichenko, A.A., Grechko, A.V., Orekhov, A.N., 2017. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1273042. <https://doi.org/10.1155/2017/1273042>
- Izaola, O., de Luis, D., Sajoux, I., Domingo, J.C., Vidal, M., 2015. [Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. *Nutr. Hosp.* 31, 2352–2358. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829>
- Jain, R.K., Munn, L.L., Fukumura, D., 2013. Measuring leukocyte-endothelial interactions in mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2013, 561–563. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot075085>
- Jensen, M.D., Ryan, D.H., Apovian, C.M., Ard, J.D., Comuzzie, A.G., Donato, K.A., Hu, F.B., Hubbard, V.S., Jakicic, J.M., Kushner, R.F., Loria, C.M., Millen, B.E., Nonas, C.A., Pi-Sunyer, F.X., Stevens, J., Stevens, V.J., Wadden, T.A., Wolfe, B.M., Yanovski, S.Z., American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, Obesity Society, 2014. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 2985–3023. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.11.004>
- Johnson, J.A., Johnson, D.A., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Vargas, M.R., Chen, P.-C., 2008. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 61–69. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.036>
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>

- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., Alnemri, E.S., 2012. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 287, 36617–36622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>
- Juutilainen, A., Kortelainen, S., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K., Laakso, M., 2004. Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk. *Diabetes Care* 27, 2898–2904. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.12.2898>
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846. <https://doi.org/10.1038/nature05482>
- Kalwat, M.A., Cobb, M.H., 2017. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. *Pharmacol. Ther.* 179, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.003>
- Kamran, M., Peterson, R.G., Dominguez, J.H., 1997. Overexpression of GLUT2 gene in renal proximal tubules of diabetic Zucker rats. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 8, 943–948.
- Kaur, R., Kaur, M., Singh, J., 2018. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc. Diabetol.* 17, 121. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3>
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Dixit, V.M., 2011. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117–121. <https://doi.org/10.1038/nature10558>
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43–50. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00231-6)
- Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., Ritov, V.B., 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944–2950. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2944>
- Khare, S., Dorfleutner, A., Bryan, N.B., Yun, C., Radian, A.D., de Almeida, L., Rojanasakul, Y., Stehlik, C., 2012. An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36, 464–476. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.001>
- Kharroubi, A.T., Darwish, H.M., 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes* 6, 850–867. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850>
- Kimak, E., Zięba, B., Duma, D., Solski, J., 2018. Myeloperoxidase level and inflammatory markers and lipid and lipoprotein parameters in stable coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* 17, 71. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0718-4>
- Kimura, H., Karasawa, T., Usui, F., Kawashima, A., Endo, Y., Kobayashi, M., Sadatomo, A., Nakamura, J., Iwasaki, Y., Yada, T., Tsutsui, H., Kasahara, T., Takahashi, M., 2016. Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 311, E881–E890. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00174.2016>

- Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., Kasuga, M., 1999. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6286–6296. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.6286>
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
- Koenen, T.B., Stienstra, R., van Tits, L.J., Joosten, L.A.B., van Velzen, J.F., Hijmans, A., Pol, J.A., van der Vliet, J.A., Netea, M.G., Tack, C.J., Stalenhoef, A.F.H., de Graaf, J., 2011. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology* 152, 3769–3778. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1480>
- Kolb, H., Martin, S., 2017. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 15, 131. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0901-x>
- Kousathana, F., Georgitsi, M., Lambadiari, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Dimitriadis, G., Mouktaroudi, M., 2017. Defective production of interleukin-1 beta in patients with type 2 diabetes mellitus: Restoration by proper glycemic control. *Cytokine* 90, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.11.009>
- Kristiansen, O.P., Mandrup-Poulsen, T., 2005. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54 Suppl 2, S114-124. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.s114
- Krolewski, A.S., Kosinski, E.J., Warram, J.H., Leland, O.S., Busick, E.J., Asmal, A.C., Rand, L.I., Christlieb, A.R., Bradley, R.F., Kahn, C.R., 1987. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 59, 750–755. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(87\)91086-1](https://doi.org/10.1016/0002-9149(87)91086-1)
- Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J.-P., Maachi, M., Quignard-Boulangé, A., Capeau, J., Caron, M., 2006. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 49, 2162–2173. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0335-z>
- Lampasona, V., Liberati, D., 2016. Islet Autoantibodies. *Curr. Diab. Rep.* 16, 53. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0738-2>
- Langer, H.F., Chavakis, T., 2009. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1211–1220. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00811.x>
- Lecube, A., Monereo, S., Rubio, M.Á., Martínez-de-Icaya, P., Martí, A., Salvador, J., Masmiquel, L., Goday, A., Bellido, D., Lurbe, E., García-Almeida, J.M., Tinahones, F.J., García-Luna, P.P., Palacio, E., Gargallo, M., Bretón, I., Morales-Conde, S., Caixàs, A., Menéndez, E., Puig-Domingo, M., Casanueva, F.F., 2017. Prevention, diagnosis, and treatment of obesity. 2016 position statement of the Spanish Society for the Study of Obesity. *Endocrinol. Diabetes Nutr.* 64 Suppl 1, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.002>

- Leeuwenberg, J.F., Smeets, E.F., Neefjes, J.J., Shaffer, M.A., Cinek, T., Jeunhomme, T.M., Ahern, T.J., Buurman, W.A., 1992. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 77, 543–549.
- Legrand-Poels, S., Esser, N., L’homme, L., Scheen, A., Paquot, N., Piette, J., 2014. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 92, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.08.013>
- Leguisamo, N.M., Lehnen, A.M., Machado, U.F., Okamoto, M.M., Markoski, M.M., Pinto, G.H., Schaan, B.D., 2012. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc. Diabetol.* 11, 100. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-100>
- Lei, L., Liu, S., Li, Yongqiang, Song, H., He, L., Liu, Q., Sun, S., Li, Yan, Feng, Z., Shen, Z., 2018. The potential role of glucokinase activator SHP289-04 in anti-diabetes and hepatic protection. *Eur. J. Pharmacol.* 826, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.036>
- Leick, M., Azcutia, V., Newton, G., Luscinskas, F.W., 2014. Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell Tissue Res.* 355, 647–656. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1809-9>
- Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.-L., Ktorza, A., Casteilla, L., Pénicaud, L., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58, 673–681. <https://doi.org/10.2337/db07-1056>
- Li, C., Zhang, J., Xue, M., Li, X., Han, F., Liu, X., Xu, L., Lu, Y., Cheng, Y., Li, T., Yu, X., Sun, B., Chen, L., 2019. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc. Diabetol.* 18, 15. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0816-2>
- Li, Y., Wang, P., Yang, X., Wang, W., Zhang, J., He, Y., Zhang, W., Jing, T., Wang, B., Lin, R., 2016. SIRT1 inhibits inflammatory response partly through regulation of NLRP3 inflammasome in vascular endothelial cells. *Mol. Immunol.* 77, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.07.018>
- Li, Y., Yang, X., He, Y., Wang, W., Zhang, J., Zhang, W., Jing, T., Wang, B., Lin, R., 2017. Negative regulation of NLRP3 inflammasome by SIRT1 in vascular endothelial cells. *Immunobiology* 222, 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.11.002>
- Ling, X., Ye, J.-F., Zheng, X.-X., 2003. Dynamic investigation of leukocyte-endothelial cell adhesion interaction under fluid shear stress in vitro. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochim. Biophys. Sin.* 35, 567–572.
- Liu, Y., Neumann, D., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., 2018. Molecular mechanism of lipid-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 136, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.06.002>
- Lloret, Ana, Esteve, D., Monllor, P., Cervera-Ferri, A., Lloret, Angeles, 2019. The Effectiveness of Vitamin E Treatment in Alzheimer’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20040879>

- Loppnow, H., Zhang, L., Buerke, M., Lautenschläger, M., Chen, L., Frister, A., Schlitt, A., Luther, T., Song, N., Hofmann, B., Rose-John, S., Silber, R.-E., Müller-Werdan, U., Werdan, K., 2011. Statins potentially reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 994–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01036.x>
- Lowe, G., Woodward, M., Hillis, G., Rumley, A., Li, Q., Harrap, S., Marre, M., Hamet, P., Patel, A., Poulter, N., Chalmers, J., 2014. Circulating inflammatory markers and the risk of vascular complications and mortality in people with type 2 diabetes and cardiovascular disease or risk factors: the ADVANCE study. *Diabetes* 63, 1115–1123. <https://doi.org/10.2337/db12-1625>
- Lu, M.-C., Ji, J.-A., Jiang, Z.-Y., You, Q.-D., 2016. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med. Res. Rev.* 36, 924–963. <https://doi.org/10.1002/med.21396>
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M., Mayer-Davis, E.J., 2010. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 39, 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.011>
- Maclaren, N., Lan, M., Coutant, R., Schatz, D., Silverstein, J., Muir, A., Clare-Salzer, M., She, J.X., Malone, J., Crockett, S., Schwartz, S., Quattrin, T., DeSilva, M., Vander Vegt, P., Notkins, A., Krischer, J., 1999. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J. Autoimmun.* 12, 279–287. <https://doi.org/10.1006/jaut.1999.0281>
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., Donath, M.Y., 2017. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 127, 1589. <https://doi.org/10.1172/JCI92172>
- Malin, S.K., Kashyap, S.R., 2014. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 21, 323–329. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000095>
- Man, S.M., Kanneganti, T.-D., 2015. Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* 265, 6–21. <https://doi.org/10.1111/imr.12296>
- Manea, S.-A., Constantin, A., Manda, G., Sasson, S., Manea, A., 2015. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox Biol.* 5, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.012>
- Martinez-Hervas, S., Martínez-Barquero, V., Nuñez Savall, E., Lendínez, V., Olivares, L., Benito, E., Real, J.T., Chaves, F.J., Ascaso, J.F., 2015. [Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms]. *Clin. E Investig. En Arterioscler. Publicacion Of. Soc. Espanola Arterioscler.* 27, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2015.04.004>

- Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J., 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>
- Matschinsky, F.M., 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39, 647–652. <https://doi.org/10.2337/diab.39.6.647>
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- Mazzone, T., Chait, A., Plutzky, J., 2008. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet Lond. Engl.* 371, 1800–1809. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60768-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60768-0)
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., Franklin, R.A., 2006. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1775–1789. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1775>
- McGillicuddy, F.C., Harford, K.A., Reynolds, C.M., Oliver, E., Claessens, M., Mills, K.H.G., Roche, H.M., 2011. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 60, 1688–1698. <https://doi.org/10.2337/db10-1278>
- Menu, P., Vince, J.E., 2011. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin. Exp. Immunol.* 166, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04440.x>
- Merovci, A., Solis-Herrera, C., Daniele, G., Eldor, R., Fiorentino, T.V., Tripathy, D., Xiong, J., Perez, Z., Norton, L., Abdul-Ghani, M.A., DeFronzo, R.A., 2014. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J. Clin. Invest.* 124, 509–514. <https://doi.org/10.1172/JCI70704>
- Mikhed, Y., Daiber, A., Steven, S., 2015. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15918–15953. <https://doi.org/10.3390/ijms160715918>
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Mogensen, C.E., 1971. Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamics during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 28, 101–109. <https://doi.org/10.3109/00365517109090668>
- Monami, M., Dicembrini, I., Kundisova, L., Zannoni, S., Nreu, B., Mannucci, E., 2014. A meta-analysis of the hypoglycaemic risk in randomized controlled trials with sulphonylureas in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 16, 833–840. <https://doi.org/10.1111/dom.12287>

- Montero, D., Walther, G., Stehouwer, C.D.A., Houben, A.J.H.M., Beckman, J.A., Vinet, A., 2014. Effect of antioxidant vitamin supplementation on endothelial function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 15, 107–116. <https://doi.org/10.1111/obr.12114>
- Moon, J.-S., Lee, S., Park, M.-A., Siempos, I.I., Haslip, M., Lee, P.J., Yun, M., Kim, C.K., Howrylak, J., Ryter, S.W., Nakahira, K., Choi, A.M.K., 2015. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *J. Clin. Invest.* 125, 665–680. <https://doi.org/10.1172/JCI78253>
- Morales-Olivas, F.J., 2016. Clinical relevance of the selectivity of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors. *Med. Clin. (Barc.)* 147 Suppl 1, 26–29. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(17\)30622-X](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(17)30622-X)
- Morrish, N.J., Wang, S.L., Stevens, L.K., Fuller, J.H., Keen, H., 2001. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44 Suppl 2, S14-21. <https://doi.org/10.1007/pl00002934>
- Munir, K.M., Davis, S.N., 2016. Differential pharmacology and clinical utility of empagliflozin in type 2 diabetes. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 8, 19–34. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S77754>
- Musatov, A., Robinson, N.C., 2012. Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic. Res.* 46, 1313–1326. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.717273>
- Nathan, D.M., Turgeon, H., Regan, S., 2007. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia* 50, 2239–2244. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0803-0>
- Navale, A.M., Paranjape, A.N., 2016. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys. Rev.* 8, 5–9. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
- Navarro-González, J.F., Mora-Fernández, C., Muros de Fuentes, M., García-Pérez, J., 2011. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* 7, 327–340. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.51>
- Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Lewis, E., Jensen, D.R., Voshol, P.J., Kullberg, B.J., Tack, C.J., van Krieken, H., Kim, S.-H., Stalenhoef, A.F., van de Loo, F.A., Verschueren, I., Pulawa, L., Akira, S., Eckel, R.H., Dinarello, C.A., van den Berg, W., van der Meer, J.W.M., 2006. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* 12, 650–656. <https://doi.org/10.1038/nm1415>
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790. <https://doi.org/10.1038/35008121>
- Nishimura, R., Tanaka, Y., Koiwai, K., Inoue, K., Hach, T., Salsali, A., Lund, S.S., Broedl, U.C., 2015. Effect of empagliflozin monotherapy on postprandial glucose and 24-hour glucose variability in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-

blind, placebo-controlled, 4-week study. *Cardiovasc. Diabetol.* 14, 11. <https://doi.org/10.1186/s12933-014-0169-9>

Noble, J.A., Valdes, A.M., 2011. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 11, 533–542. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0223-x>

Oelze, M., Kröller-Schön, S., Welschof, P., Jansen, T., Hausding, M., Mikhed, Y., Stamm, P., Mader, M., Zinßius, E., Agdauletova, S., Gottschlich, A., Steven, S., Schulz, E., Bottari, S.P., Mayoux, E., Münzel, T., Daiber, A., 2014. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PloS One* 9, e112394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112394>

Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J.M., Boeke, J.D., Feinberg, A.P., 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13653–13658. <https://doi.org/10.1073/pnas.222538099>

Osorio, H., Coronel, I., Arellano, A., Pacheco, U., Bautista, R., Franco, M., Escalante, B., 2012. Sodium-glucose cotransporter inhibition prevents oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 542042. <https://doi.org/10.1155/2012/542042>

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., Walsh, K., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>

Ozaki, E., Campbell, M., Doyle, S.L., 2015. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J. Inflamm. Res.* 8, 15–27. <https://doi.org/10.2147/JIR.S51250>

Patti, M.-E., Corvera, S., 2010. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 31, 364–395. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0027>

Pavlou, D.I., Paschou, S.A., Anagnostis, P., Spartalis, M., Spartalis, E., Vryonidou, A., Tentolouris, N., Siasos, G., 2018. Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. *Maturitas* 112, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.03.013>

Pellegrini, C., Antonioli, L., Lopez-Castejon, G., Blandizzi, C., Fornai, M., 2017. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* 8, 36. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00036>

Pellegrino, M.W., Nargund, A.M., Haynes, C.M., 2013. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.019>

Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2006. Etiology of insulin resistance. *Am. J. Med.* 119, S10-16. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.01.009>

Pham, S.V., Chilton, R., 2017. EMPA-REG OUTCOME: The Cardiologist's Point of View. *Am. J. Med.* 130, S57–S62. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.04.006>

- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem. IJCB* 30, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Proud, C.G., Wang, X., Patel, J.V., Campbell, L.E., Kleijn, M., Li, W., Browne, G.J., 2001. Interplay between insulin and nutrients in the regulation of translation factors. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 541–547. <https://doi.org/10.1042/bst0290541>
- Pyörälä, K., Pedersen, T.R., Kjekshus, J., Faergeman, O., Olsson, A.G., Thorgeirsson, G., 1997. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 20, 614–620. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.4.614>
- Rabøl, R., Højberg, P.M.V., Almdal, T., Boushel, R., Haugaard, S.B., Madsbad, S., Dela, F., 2009. Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1372–1378. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1475>
- Rajasekeran, H., Lytvyn, Y., Cherney, D.Z.I., 2016. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: the emerging role of natriuresis. *Kidney Int.* 89, 524–526. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.12.038>
- Ramnanan, C.J., Edgerton, D.S., Kraft, G., Cherrington, A.D., 2011. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes. Metab.* 13 Suppl 1, 118–125. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01454.x>
- Richter, E.A., Hargreaves, M., 2013. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* 93, 993–1017. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2012>
- Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., Han, W., 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 48, e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Makuc, D.M., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., Moy, C.S., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nichol, G., Paynter, N.P., Soliman, E.Z., Sorlie, P.D., Sotoodehnia, N., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, 2012. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125, e2–e220. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31823ac046>
- Rossetti, L., Smith, D., Shulman, G.I., Papachristou, D., DeFronzo, R.A., 1987. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 79, 1510–1515. <https://doi.org/10.1172/JCI112981>
- Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U., 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* 278, 45777–45784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301977200>
- Rovira-Llopis, S., Apostolova, N., Bañuls, C., Muntané, J., Rocha, M., Victor, V.M., 2018. Mitochondria, the NLRP3 Inflammasome, and Sirtuins in Type 2 Diabetes: New

Therapeutic Targets. Antioxid. Redox Signal. 29, 749–791.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7313>

Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Apostolova, N., Morillas, C., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., Victor, V.M., 2014. Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1759–1765.
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.6030>

Rovira-Llopis, S., Rocha, M., Falcon, R., de Pablo, C., Alvarez, A., Jover, A., Hernandez-Mijares, A., Victor, V.M., 2013. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1452–1458. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5307>

Russell-Jones, D., Khan, R., 2007. Insulin-associated weight gain in diabetes--causes, effects and coping strategies. *Diabetes Obes. Metab.* 9, 799–812. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00686.x>

Sack, M.N., Finkel, T., 2012. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013102>

Sánchez-Recalde A, null, Carlos Kaski, J., 2001. [Diabetes mellitus, inflammation and coronary atherosclerosis: current and future perspectives]. *Rev. Esp. Cardiol.* 54, 751–763.
[https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(01\)76390-7](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(01)76390-7)

Sattar, N., McLaren, J., Kristensen, S.L., Preiss, D., McMurray, J.J., 2016. SGLT2 Inhibition and cardiovascular events: why did EMPA-REG Outcomes surprise and what were the likely mechanisms? *Diabetologia* 59, 1333–1339. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3956-x>

Sattar, N., Petrie, M.C., Zinman, B., Januzzi, J.L., 2017. Novel Diabetes Drugs and the Cardiovascular Specialist. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 2646–2656.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.014>

Scharnagl, H., Kleber, M.E., Genser, B., Kickmaier, S., Renner, W., Weihrauch, G., Grammer, T., Rossmann, C., Winkelmann, B.R., Boehm, B.O., Sattler, W., März, W., Malle, E., 2014. Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular mortality in individuals undergoing coronary angiography--the LURIC study. *Int. J. Cardiol.* 174, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.03.168>

Schnoor, M., 2015. Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 3535–3541.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403250>

Sha, W., Mitoma, H., Hanabuchi, S., Bao, M., Weng, L., Sugimoto, N., Liu, Y., Zhang, Z., Zhong, J., Sun, B., Liu, Y.-J., 2014. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16059–16064.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1412487111>

Shah, M.S., Brownlee, M., 2016. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ. Res.* 118, 1808–1829.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306923>

- Shepherd, P.R., Withers, D.J., Siddle, K., 1998. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333 (Pt 3), 471–490. <https://doi.org/10.1042/bj3330471>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature13683>
- Shin, S.J., Chung, S., Kim, S.J., Lee, E.-M., Yoo, Y.-H., Kim, J.-W., Ahn, Y.-B., Kim, E.-S., Moon, S.-D., Kim, M.-J., Ko, S.-H., 2016. Effect of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Dapagliflozin, on Renal Renin-Angiotensin System in an Animal Model of Type 2 Diabetes. *PloS One* 11, e0165703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165703>
- Shio, M.T., Tiemi Shio, M., Eisenbarth, S.C., Savaria, M., Vinet, A.F., Bellemare, M.-J., Harder, K.W., Sutterwala, F.S., Bohle, D.S., Descoteaux, A., Flavell, R.A., Olivier, M., 2009. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog.* 5, e1000559. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000559>
- Shirasuna, K., Takano, H., Seno, K., Ohtsu, A., Karasawa, T., Takahashi, M., Ohkuchi, A., Suzuki, H., Matsubara, S., Iwata, H., Kuwayama, T., 2016. Palmitic acid induces interleukin-1 β secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. *J. Reprod. Immunol.* 116, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.06.001>
- Shoelson, S.E., Lee, J., Goldfine, A.B., 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>
- Shurtz-Swirski, R., Sela, S., Herskovits, A.T., Shasha, S.M., Shapiro, G., Nasser, L., Kristal, B., 2001. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 24, 104–110. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.1.104>
- Simpson, N.J., Ferguson, A.V., 2017. The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α excites subfornical organ neurons. *J. Neurophysiol.* 118, 1532–1541. <https://doi.org/10.1152/jn.00238.2017>
- Singh, D.K., Winocour, P., Farrington, K., 2011. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 176–184. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.212>
- Singh, U., Dasu, M.R., Yancey, P.G., Afify, A., Devaraj, S., Jialal, I., 2008. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J. Lipid Res.* 49, 1015–1023. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700535-JLR200>
- Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., 2009. C-reactive protein stimulates myeloperoxidase release from polymorphonuclear cells and monocytes: implications for acute coronary syndromes. *Clin. Chem.* 55, 361–364. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.109207>
- Snodgrass, R.G., Huang, S., Choi, I.-W., Rutledge, J.C., Hwang, D.H., 2013. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation;

modulation by dietary fatty acids. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 4337–4347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298>

Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M., Prolla, T.A., 2010. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143, 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.002>

Spahis, S., Delvin, E., Borys, J.-M., Levy, E., 2017. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 519–541. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6776>

Stehlik, C., 2007. The PYRIN domain in signal transduction. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8, 293–310. <https://doi.org/10.2174/138920307780831857>

Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-Schön, S., Kashani, F., Roohani, S., Welschhof, P., Kopp, M., Gödtel-Armbrust, U., Xia, N., Li, H., Schulz, E., Lackner, K.J., Wojnowski, L., Bottari, S.P., Wenzel, P., Mayoux, E., Münzel, T., Daiber, A., 2017. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* 13, 370–385. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.06.009>

Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., Hadden, D., Turner, R.C., Holman, R.R., 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321, 405–412. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.405>

Sugamura, K., Keaney, J.F., 2011. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 978–992. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>

Sugizaki, T., Zhu, S., Guo, G., Matsumoto, A., Zhao, J., Endo, M., Horiguchi, H., Morinaga, J., Tian, Z., Kadomatsu, T., Miyata, K., Itoh, H., Oike, Y., 2017. Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality. *NPJ Aging Mech. Dis.* 3, 12. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0012-0>

Summers, S.A., Kao, A.W., Kohn, A.D., Backus, G.S., Roth, R.A., Pessin, J.E., Birnbaum, M.J., 1999. The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 17934–17940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17934>

Suresh, R., Mosser, D.M., 2013. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv. Physiol. Educ.* 37, 284–291. <https://doi.org/10.1152/advan.00058.2013>

Surmi, B.K., Hasty, A.H., 2008. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol.* 3, 545–556. <https://doi.org/10.2217/17460875.3.5.545>

Tao, R., Coleman, M.C., Pennington, J.D., Ozden, O., Park, S.-H., Jiang, H., Kim, H.-S., Flynn, C.R., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, A.K., Spitz, D.R., Gius, D., 2010. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol. Cell* 40, 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.013>

- Teng, N., Maghzal, G.J., Talib, J., Rashid, I., Lau, A.K., Stocker, R., 2017. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 22, 51–73. <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1256119>
- Traba, J., Geiger, S.S., Kwarteng-Siaw, M., Han, K., Ra, O.H., Siegel, R.M., Gius, D., Sack, M.N., 2017. Prolonged fasting suppresses mitochondrial NLRP3 inflammasome assembly and activation via SIRT3-mediated activation of superoxide dismutase 2. *J. Biol. Chem.* 292, 12153–12164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.791715>
- Traba, J., Kwarteng-Siaw, M., Okoli, T.C., Li, J., Huffstutler, R.D., Bray, A., Waclawiw, M.A., Han, K., Pelletier, M., Sauve, A.A., Siegel, R.M., Sack, M.N., 2015. Fasting and refeeding differentially regulate NLRP3 inflammasome activation in human subjects. *J. Clin. Invest.* 125, 4592–4600. <https://doi.org/10.1172/JCI83260>
- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133–146. <https://doi.org/10.1038/nri1001>
- Tully, C., Aronow, L., Mackey, E., Streisand, R., 2016. Physical Activity in Youth With Type 1 Diabetes: a Review. *Curr. Diab. Rep.* 16, 85. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0779-6>
- UKPDS Group, 1998a. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet Lond. Engl.* 352, 854–865.
- UKPDS Group, 1998b. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet Lond. Engl.* 352, 837–853.
- Urcelay, E., Santiago, J.L., de la Calle, H., Martínez, A., Méndez, J., Ibarra, J.M., Maluenda, C., Fernández-Arquero, M., de la Concha, E.G., 2005. Type 1 diabetes in the Spanish population: additional factors to class II HLA-DR3 and -DR4. *BMC Genomics* 6, 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-56>
- Vaccaro, O., Eberly, L.E., Neaton, J.D., Yang, L., Riccardi, G., Stamler, J., Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group, 2004. Impact of diabetes and previous myocardial infarction on long-term survival: 25-year mortality follow-up of primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arch. Intern. Med.* 164, 1438–1443. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.13.1438>
- Van Gaal, L., Scheen, A., 2015. Weight management in type 2 diabetes: current and emerging approaches to treatment. *Diabetes Care* 38, 1161–1172. <https://doi.org/10.2337/dc14-1630>
- van Greevenbroek, M.M.J., Schalkwijk, C.G., Stehouwer, C.D.A., 2013. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth. J. Med.* 71, 174–187.

- Vettor, R., Inzucchi, S.E., Fioretto, P., 2017. The cardiovascular benefits of empagliflozin: SGLT2-dependent and -independent effects. *Diabetologia* 60, 395–398. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4194-y>
- Vozarova, B., Weyer, C., Lindsay, R.S., Pratley, R.E., Bogardus, C., Tataranni, P.A., 2002. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 455–461. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2.455>
- Wacker, M.A., Teghanemt, A., Weiss, J.P., Barker, J.H., 2017. High-affinity caspase-4 binding to LPS presented as high molecular mass aggregates or in outer membrane vesicles. *Innate Immun.* 23, 336–344. <https://doi.org/10.1177/1753425917695446>
- Wannamethee, S.G., Shaper, A.G., Lennon, L., 2004. Cardiovascular disease incidence and mortality in older men with diabetes and in men with coronary heart disease. *Heart Br. Card. Soc.* 90, 1398–1403. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.026104>
- Weber, C., Noels, H., 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 17, 1410–1422. <https://doi.org/10.1038/nm.2538>
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115, 1111–1119. <https://doi.org/10.1172/JCI25102>
- Wen, H., Miao, E.A., Ting, J.P.-Y., 2013. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity* 39, 432–441. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.037>
- Wenzlau, J.M., Walter, M., Gardner, T.J., Frisch, L.M., Yu, L., Eisenbarth, G.S., Ziegler, A.-G., Davidson, H.W., Hutton, J.C., 2010. Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 4712–4719. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0169>
- Weykamp, C., 2013. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Ann. Lab. Med.* 33, 393–400. <https://doi.org/10.3343/alm.2013.33.6.393>
- WHO [WWW Document], 2019. URL https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
- Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., 2008. Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 44, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.004>
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.5.1047>
- Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., 2000. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 403–409. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00204-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00204-5)
- Wright, E.M., 2001. Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F10-18. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.1.F10>

Xing, J.-H., Li, R., Gao, Y.-Q., Wang, M.-Y., Liu, Y.-Z., Hong, J., Dong, J.-Z., Gu, H.-P., Li, L., 2019. NLRP3 inflammasome mediate palmitate-induced endothelial dysfunction. *Life Sci.* 239, 116882. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116882>

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., McGeer, P.L., 2001. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* 158, 1039–1051. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64051-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64051-5)

Youm, Y.-H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T.D., Kang, S., Horvath, T.L., Fahmy, T.M., Crawford, P.A., Biragyn, A., Alnemri, E., Dixit, V.D., 2015. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat. Med.* 21, 263–269. <https://doi.org/10.1038/nm.3804>

Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., Mohamed-Ali, V., 2000. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148, 209–214. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00463-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00463-3)

Zachara, N.E., Hart, G.W., 2006. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 599–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.04.007>

Zarzuelo, M.J., López-Sepúlveda, R., Sánchez, M., Romero, M., Gómez-Guzmán, M., Ungvary, Z., Pérez-Vizcaíno, F., Jiménez, R., Duarte, J., 2013. SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1288–1296. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.015>

Zhang, J., Xiang, L., Zhang, B., Cheng, Y., 2017. Endothelial dysfunction in normoglycaemic first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus complicated with hyperuricaemia. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 14, 88–93. <https://doi.org/10.1177/1479164116678158>

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., Broedl, U.C., Inzucchi, S.E., EMPA-REG OUTCOME Investigators, 2015. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 373, 2117–2128. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504720>

ANEXO I. PUBLICACIONES

Does Glycemic Control Modulate the Impairment of NLRP3 Inflammasome Activation in Type 2 Diabetes?

Francesca Iannantuoni,^{1,*} Noelia Diaz-Morales,^{1,*} Irene Escribano-Lopez,¹ Eva Sola,¹ Ildefonso Roldan-Torres,² Nadezda Apostolova,³ Celia Bañuls,¹ Susana Rovira-Llopis,¹ Milagros Rocha,^{1,3} and Victor M. Victor^{1,3,4}

Abstract

Since mitochondrial dysfunction is associated with NOD-like receptor family protein 3 (NLRP3) activation in type 2 diabetes (T2D), which can eventually lead to an impaired immune response, we set out to determine if glycemic control modulates the effects of T2D on the NLRP3 inflammasome. We have studied leukocytes from 61 diabetic patients [25 with glycated hemoglobin (HbA_{1c}) ≤7% and 36 with HbA_{1c} ≥8%] and 40 healthy controls. Total and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production was enhanced in T2D patients, and mitochondrial ROS was more pronounced in those with poor glycemic control. Levels of gene and protein expression of NLRP3 were decreased in both diabetic groups and more so in those with HbA_{1c} ≥8%. In addition, there was a decrease in gene expression and serum concentrations of interleukin (IL)-1 β , IL-12, and caspase-1 in line with inhibition of the NLRP3 inflammasome. Our data also suggest negative correlations between HbA_{1c} levels and NLRP3 protein expression, serum levels of IL-12 and IL-1 β , and *caspase-1* messenger RNA expression. Our findings lead us to raise the hypothesis of an association between poor glycemic control in T2D and an impairment of the NLRP3 inflammasome, suggesting that glycemic control plays an important role in the immune response of diabetic subjects. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

Keywords: glycaemic control, type 2 diabetes, mitochondrial function, NLRP3 inflammasome, oxidative stress

Introduction

TYPE 2 DIABETES (T2D) is a chronic pathology associated with insulin resistance, obesity, cardiovascular disease (CVD), and chronic low-grade inflammation that has dramatically increased over recent years.

There is clear evidence that the immune system plays a key role in the pathogenesis of T2D. T2D involves key mechanisms such as oxidative stress, proinflammatory cytokine release, Toll-like receptor expression, and alterations of the inflammasome. Inflammatory mediators such as interleukin (IL)-1 β and IL-18 promote initiation and progression of metabolic diseases by activating the NOD-like receptor family protein 3 (NLRP3)

inflammasome, which is involved in a large number of metabolic diseases (1).

NLRP3 is a multiprotein complex comprising the NLR scaffold protein, caspase recruitment domain (CARD), speck-like protein containing CARD, and procaspase-1. This complex, which is normally inactive, can be activated by nuclear factor-kappa B or by pathogen- and damage-associated molecular patterns. When activated, NLRP3 promotes caspase-1 activation by autocatalytic cleavage of procaspase-1, which leads to IL-1 β maturation and secretion.

A review of the bibliography reveals discrepancies when looking at possible associations between the NLRP3 inflammasome response and T2D or hyperglycemia conditions.

¹Service of Endocrinology and Nutrition, ²Service of Cardiology, University Hospital Doctor Peset, Foundation for Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain.

³CIBERehd—Department of Pharmacology, University of Valencia, Valencia, Spain.

⁴Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

Innovation

Type 2 diabetes (T2D) is related to mitochondrial dysfunction and modification of the redox state, which leads to impairment of the immune response. The role played by glycemic control has not yet been fully understood. The present study not only confirms that the glycemic state can modulate mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production but also suggests that it has a key role in NOD-like receptor family protein 3 (NLRP3) inflammasome activation in leukocytes of T2D patients (poorly controlled patients show enhanced levels of mitochondrial ROS and decreased expression levels of NLRP3, interleukin (IL)-1 β , IL-12, IL-18, and caspase-1). Therefore, ensuring glycemic control in T2D patients could improve the mitochondrial function and NLRP3 inflammasome response of their leukocytes and therefore maintain an adequate immune response.

On the one hand, IL-1 β production by macrophages and pancreatic islets is increased by high-glucose concentrations *in vivo* (4). On the other hand, Kousathana *et al.* (3) demonstrated a decrease of IL-1 β levels in T2D patients. Either way, the mechanism by which IL-1 β acts in T2D is yet to be determined.

Mitochondrial impairment and enhanced levels of reactive oxygen species (ROS) have been widely related to T2D (2), especially when T2D patients present poor glycemic control (6). ROS production is essential for inflammasome activation and therefore for the inflammatory response. Furthermore, an adequate control of glycemia is key to preventing complications associated with T2D. In this sense, we have demonstrated that poor glycemic control is associated with development of endoplasmic reticulum stress and leukocyte–endothelium interactions (2, 6). However, knowledge about the possible influence of glycemic control on activation of NLRP3 inflammasome is scarce.

To shed light on a potential involvement of glycemic control in oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation, we have evaluated total and mitochondrial ROS production as well as expression levels of the principal NLRP3 markers in nonstimulated leukocytes from control subjects and T2D patients.

Results

Anthropometric and biochemical parameters

Our cohort of patients comprised 61 type 2 diabetic patients [25 with glycated hemoglobin (HbA_{1c}) levels $\leq 7\%$ and 36 with HbA_{1c} $\geq 8\%$] and 40 healthy subjects. Anthropometric and metabolic characteristics of the study population are shown in Table 1. We observed significant differences in weight, body-mass index (BMI), and waist circumference, all of which were higher in diabetic patients than in control subjects ($p < 0.001$). T2D patients (both groups) also showed differences in glucose metabolism—augmented levels of fasting glucose, insulin, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, and HbA_{1c} ($p < 0.001$) with respect to the control group.

When we analyzed the lipid profile, we found lower levels of total cholesterol (TC) ($p < 0.05$ only for the HbA_{1c} $\leq 7\%$ group), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) ($p < 0.001$), and

low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) ($p < 0.05$) and higher levels of triglycerides (TGs) ($p < 0.001$) in both T2D groups, while high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was enhanced in those with poor glycemic control ($p < 0.01$) compared to controls.

Since diabetic patients showed higher BMI than controls, the data were adjusted for BMI, but statistical differences remained. When we explored differences between T2D patients due to glycemic control, we obtained statistical differences in glucose metabolism, but not in the lipid profile, with augmented levels of fasting glucose ($p < 0.001$), insulin ($p < 0.05$), HOMA-IR index ($p < 0.001$), and HbA_{1c} ($p < 0.001$) in the group with poor glycemic control with respect to well-controlled diabetic patients. Statistical differences remained when the analysis was adjusted for BMI.

To study the impact of pharmacological treatment on the results, we compared proportions of patients treated with different drugs. No statistical differences were found between diabetic groups.

Total and mitochondrial ROS production

Total and mitochondrial ROS production was assessed in leukocytes from T2D and control subjects (Fig. 1). Leukocytes from diabetic patients showed enhanced levels of total ROS production with respect to those from controls ($p < 0.01$; Fig. 1A). When diabetic patients were divided according to HbA_{1c} levels $\leq 7\%$ and $\geq 8\%$, we observed increased total ROS production in both groups of diabetic patients ($p < 0.01$; Fig. 1B, C). With regard to mitochondrial ROS production, an increase in T2D patients was observed ($p < 0.01$; Fig. 1D) with respect to controls. Furthermore, whereas T2D patients with HbA_{1c} $\leq 7\%$ showed a slight increase in mitochondrial ROS production ($p < 0.05$ vs. controls), T2D patients with poor glycemic control (HbA_{1c} $\geq 8\%$) displayed a more pronounced increase in mitochondrial ROS production ($p < 0.001$ vs. controls and $p < 0.05$ vs. HbA_{1c} $\leq 7\%$ group; Fig. 1E, F).

Inflammasome NLRP3 measurements

We assessed leukocyte messenger RNA (mRNA) and protein expression levels of NLRP3 and observed a decrease in both mRNA ($p < 0.05$; Fig. 2A) and protein ($p < 0.001$; Fig. 2C) expression levels in T2D patients with respect to controls. The decreases in NLRP3 mRNA and protein expression levels were particularly pronounced among T2D patients with poor glycemic control (HbA_{1c} $\geq 8\%$; Fig. 2B, D). Representative unedited blots showing protein expression of NLRP3 and actin are shown in Supplementary Figures S1 and S2 (Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/ars). In fact, statistically significant differences in NLRP3 mRNA expression levels ($p < 0.05$; Fig. 2B) and in NLRP3 protein levels ($p < 0.01$; Fig. 2D) were found between the two T2D groups.

When mRNA expression levels of *caspase-1* were analyzed in leukocytes, we observed a decrease in T2D with respect to controls ($p < 0.05$; Fig. 2E). Although patients with HbA_{1c} levels $\leq 7\%$ showed a slight decrease in mRNA levels of *caspase-1*, it did not reach statistical significance. However, the reduction in *caspase-1* mRNA levels was more pronounced in patients with HbA_{1c} $\geq 8\%$ and was significant when compared with control subjects ($p < 0.01$) and well-controlled patients ($p < 0.05$; Fig. 2F).

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC AND METABOLIC PARAMETERS AND PHARMACOLOGICAL TREATMENT OF THE STUDY POPULATION

	Control	T2D with HbA _{1c} ≤7%	T2D with HbA _{1c} ≥8%	p-Value	BMI-adjusted p-value
N	40	25	36		
Age (years)	54.9±7.3	58.8±7.3	57.2±9.7	ns	
Weight (kg)	73.0±15.6	89±15***	86.9±18.7***	<0.001	
BMI (kg/m ²)	26.6±4.6	31±3.9***	30.7±6.3***	<0.001	
Waist (cm)	89.2±13.5	106.8±10.3***	107.2±15.5***	<0.001	
Glucose (mg/dL)	94.2±11.5	106.6±19**	203.3±68.8***.###	<0.001	<0.001
Insulin (μU/ml)	8.89±4.87	12±3.66*	17.63±14.52***.#	<0.001	<0.01
HOMA-IR	2.12±1.30	3.29±1.26*	8.3±6.44***.###	<0.001	<0.001
HbA _{1c} (%)	5.37±0.32	5.68±0.22***	9.49±1.18***.###	<0.001	<0.001
TC (mg/dL)	208.4±31.6	166.8±32.7*	175.69±34.4	<0.05	<0.05
HDL-c (mg/dL)	54.6±12.9	43.2±10.7*	41.7±11.1*	<0.001	<0.001
LDL-c (mg/dL)	131.9±27.4	97.3±30***	97.2±27.8***	<0.05	<0.01
TG (mg/dL)	92 (64.5–131)	120 (96.8–183)***	150 (102–267)**	<0.001	<0.001
hs-CRP (mg/L)	1.19 (0.57–2.6)	2.8 (1.3–7.1)	4.6 (1.4–11.1)**	<0.001	<0.001
Treatment (%)					
Antihypertensive	—	52.0	42.9	ns	
Metformin	—	80	65.7	ns	
DPP-4 inhibitor	—	52	51.4	ns	
Sulfonylurea	—	4	0	ns	
Glitazone	—	4	5.57	ns	
Glinide	—	4	11.4	ns	
GLP-1 agonist	—	12	17.1	ns	
Statin	—	56	60	ns	
Fibrate	—	20	17.1	ns	
Ezetimibe	—	4	5.7	ns	

Values are expressed as mean ± standard deviation for parametric data and as median (25th and 75th percentiles) for nonparametric data. The three groups were compared with one-way analysis of variance (and Student–Newman–Keuls *post hoc* test) or Kruskal–Wallis test (and Dunn's multiple comparison *post hoc* test) for parametric and nonparametric data, respectively. Analysis of covariance was performed with a univariate general linear model using BMI as a covariate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ with respect to control, # $p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ with respect to T2D with HbA_{1c} ≤7%.

BMI, body–mass index; DPP-4, dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, glucagon-like peptide; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; ns, non-significant; T2D, type 2 diabetes; TC, total cholesterol; TG, triglycerides.

Proinflammatory cytokine measurement

When we evaluated cytokine levels, we observed a decrease of *IL-18* mRNA expression level, but did not observe significant differences between diabetic individuals and controls (Fig. 3A, B). Interestingly, a drop in *IL-1β* was observed in T2D patients not only in leukocyte mRNA expression levels ($p < 0.05$; Fig. 3C) but also in serum *IL-1β* concentration ($p < 0.01$; Fig. 3E). When T2D patients were split according to glycemic control, we witnessed that mRNA expression levels were specifically reduced in HbA_{1c} ≥8% diabetic patients ($p < 0.05$; Fig. 3D), while serum *IL-1β* levels decreased significantly in both T2D groups ($p < 0.05$ in HbA_{1c} ≤7% and $p < 0.01$ in HbA_{1c} ≥8%) with respect to controls, showing a more pronounced drop in patients with poor glycemic control ($p < 0.05$ with respect to the HbA_{1c} ≤7% group; Fig. 3F).

IL-12 serum levels were decreased in T2D patients ($p < 0.001$; Fig. 3G). In addition, the decline in serum *IL-12* concentration was more marked in poorly controlled patients ($p < 0.01$ with respect to controls and $p < 0.05$ compared with well-controlled patients; Fig. 3H).

Correlation studies

We further evaluated the role of glycemic control during T2D on inflammasome activation by exploring possible

correlations between HbA_{1c} and NLRP3 inflammasome activation-related factors. Interestingly, we found negative correlations between HbA_{1c} levels and NLRP3 protein expression ($p < 0.05$, $r = -0.438$), production of *IL-12* and *IL-1β* ($p < 0.05$, $r = -0.476$, and $p < 0.01$, $r = -0.555$, respectively), and *caspase-1* mRNA expression levels ($p < 0.05$, $r = -0.408$).

Discussion

We have studied the involvement of glycemic control in oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation by evaluating total and mitochondrial ROS production and expression levels of the principal NLRP3 markers in non-stimulated leukocytes from control subjects and T2D patients. In this context, it is relevant that T2D and hyperglycemia can cause disturbances in the redox state, thereby contributing to development of vascular complications. Furthermore, we have demonstrated in previous studies that mitochondrial dysfunction and ROS production are present in leukocytes of T2D patients and are related to macro- and microvascular complications (2).

In this study, we have observed an increase in total and mitochondrial ROS production in leukocytes from T2D patients, which was more pronounced in subjects with poor glycemic control (HbA_{1c} ≥8%), suggesting that leukocyte mitochondrial function is altered during chronic hyperglycemia.

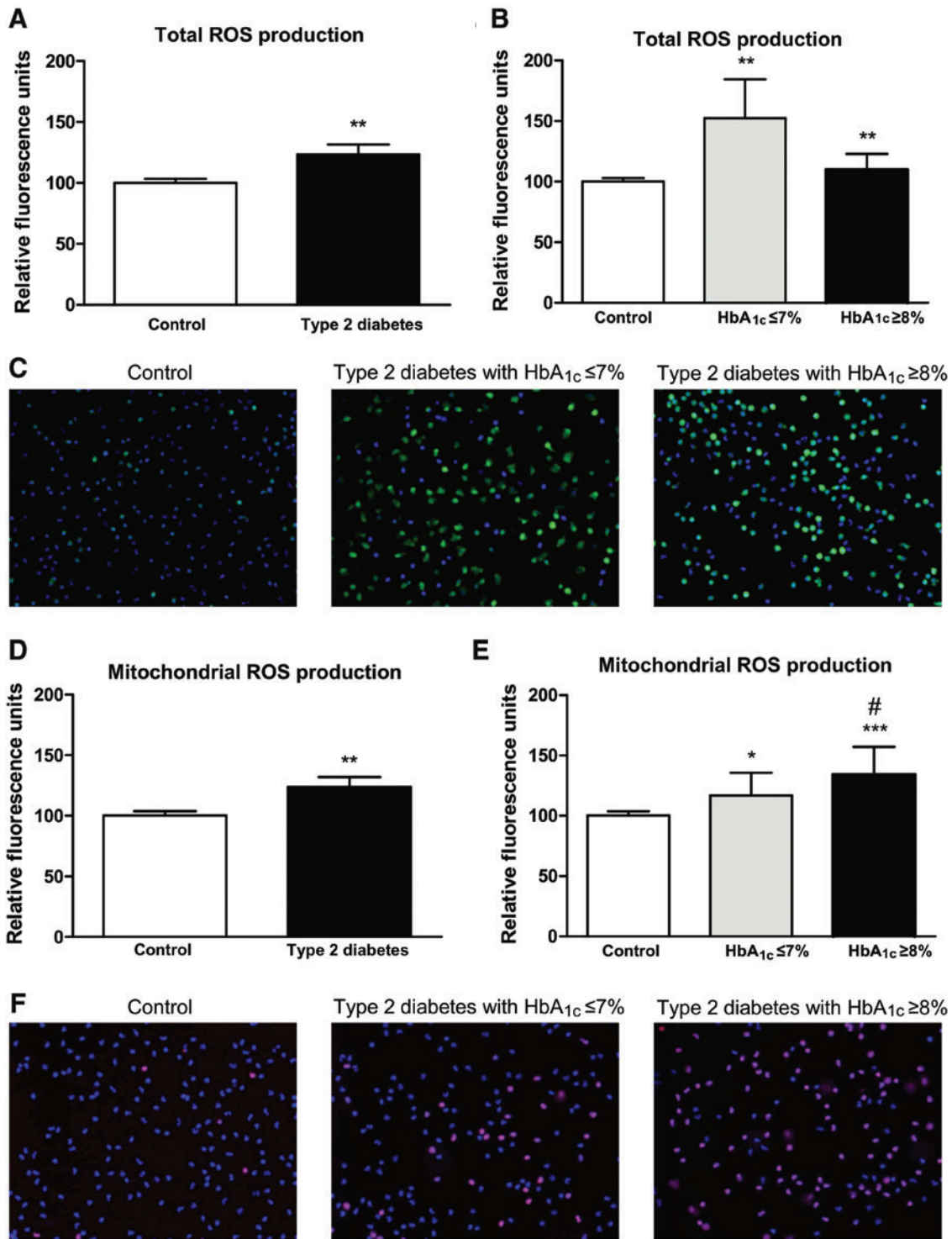
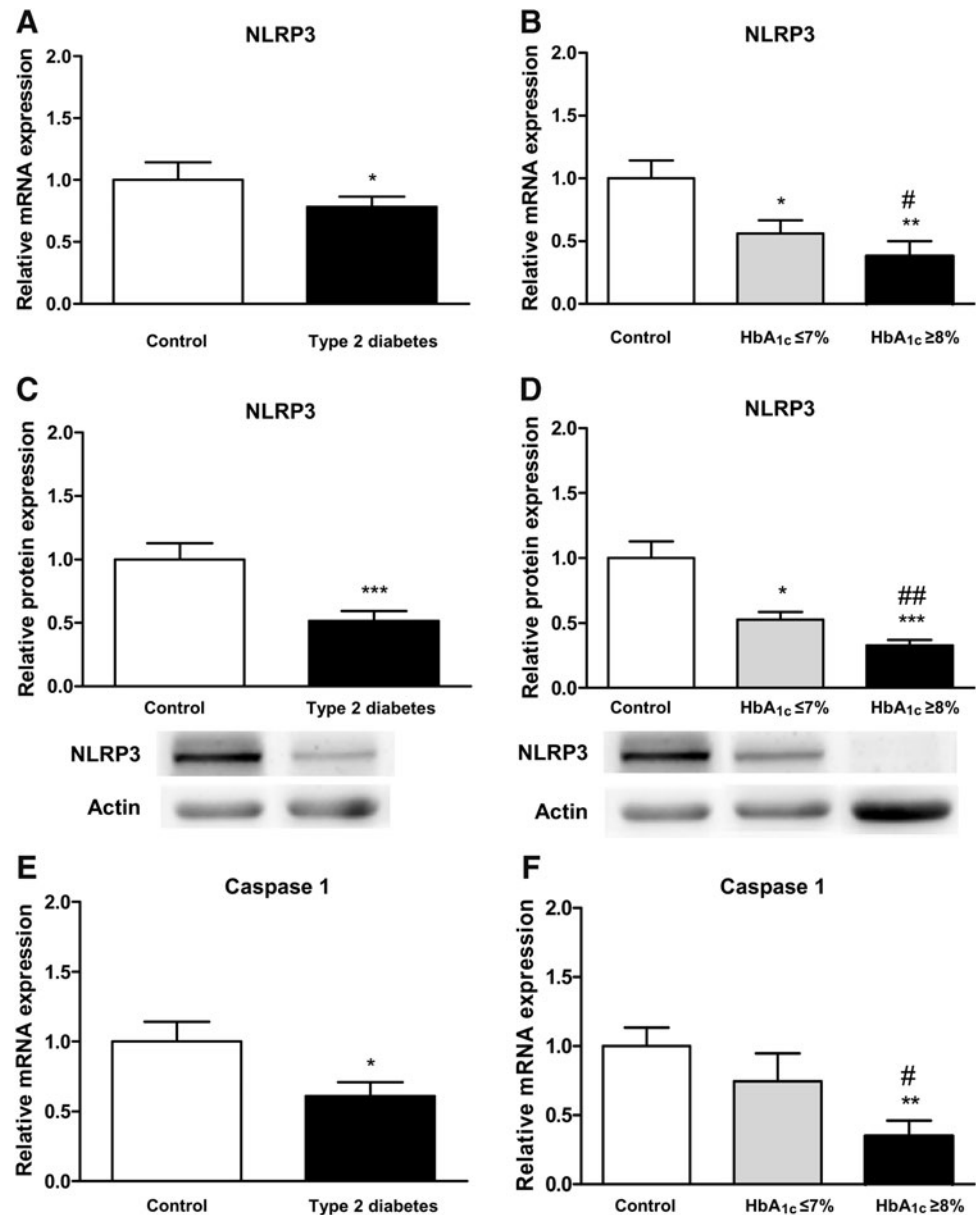


FIG. 1. Total ROS production and mitochondrial ROS production in leukocytes of control subjects and diabetic patients. (A, B) Levels of total ROS measured as DCFH-DA fluorescence and expressed as arbitrary units. (C) Representative images of leukocytes stained with DCFH-DA (green) and Hoechst 33342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy. (D, E) Levels of mitochondrial ROS measured as MitoSOX Red fluorescence and expressed as arbitrary units. (F) Representative images of leukocytes stained with MitoSOX (red) and Hoechst 33342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ with respect to control volunteers. # $p < 0.05$ when compared with HbA_{1c} ≤7%. DCFH-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; MitoSOX, MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator; ROS, reactive oxygen species; T2D, type 2 diabetes. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

FIG. 2. Assessment of NLRP3 inflammasome and assessment of caspase-1 in control subjects and diabetic patients with $HbA_{1c} \leq 7\%$ and $HbA_{1c} \geq 8\%$. (A) NLRP3 mRNA expression in controls and diabetic patients. (B) NLRP3 mRNA expression in controls and diabetic patients separated by HbA_{1c} . (C) Graph showing NLRP3 protein expression and representative Western blot images of NLRP3 and actin proteins. Unedited blots are shown in Supplementary Figure S1. (D) Graph showing NLRP3 protein expression and representative Western blot images of NLRP3 and actin in controls and diabetic patients separated by HbA_{1c} . Unedited blots are shown in Supplementary Figure S2. (E) Caspase-1 mRNA expression in controls and diabetic patients. (F) Caspase-1 mRNA expression in controls and diabetic patients separated by $HbA_{1c} \leq 7\%$ and $HbA_{1c} \geq 8\%$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ when compared with control volunteers. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ with respect to diabetic patients with $HbA_{1c} \leq 7\%$. mRNA, messenger RNA; NLRP3, NOD-like receptor family protein 3.



Oxidative stress, redox imbalance, and mitochondrial function are linked to activation of the NLRP3 inflammasome, which is in turn linked to chronic inflammation in insulin resistance-associated diseases (5). In fact, activation of the NLRP3 inflammasome induces production of IL-1 β in T2D patients and in animal models of obesity (1, 5). Saturated fatty acids, such as palmitate, can also induce NLRP3 inflammasome activation in hematopoietic cells, thus contributing to insulin resistance and glucose intolerance (8). Notwithstanding, the bibliography contains controversial evidence, perhaps as a consequence of the use of different types of cells, drug treatments, or the fact that cells have been usually activated *in vitro* by substances that can promote inflammasome activation, thus leading to generation of contradictory data.

In our study, we have evaluated leukocytes from T2D patients and their respective controls without *in vitro* stimuli to observe a naïve inflammatory response. We have seen a decrease in NLRP3 mRNA expression and protein levels suggestive of considerable impairment of the inflammatory

response in leukocytes from this cohort of diabetic patients. In fact, the decrease in NLRP3 expression was more evident in T2D with poor metabolic control.

Our results are in line with those obtained by Kousathana *et al.* (3) who reported a defective production of proinflammatory cytokines and NLRP3 activation in leukocytes from diabetic patients. Furthermore, it is known that regulation of the activation of NLRP3 varies depending on nutrient levels (7). Traba *et al.* (7) also demonstrated in peripheral blood mononuclear cells induced with lipopolysaccharide and adenosine triphosphate that redox stress during fasted state can activate sirtuin 3, which in turn is able to modulate mitochondrial ROS production through inhibition of NLRP3 inflammasome and repressing the cleavage of caspase-1 (7).

Therefore, alterations in mitochondrial function by other pathways might induce innate immunological activations, clearly pointing to interaction between the innate immune system and mitochondrial function. NLRP3 inflammasome

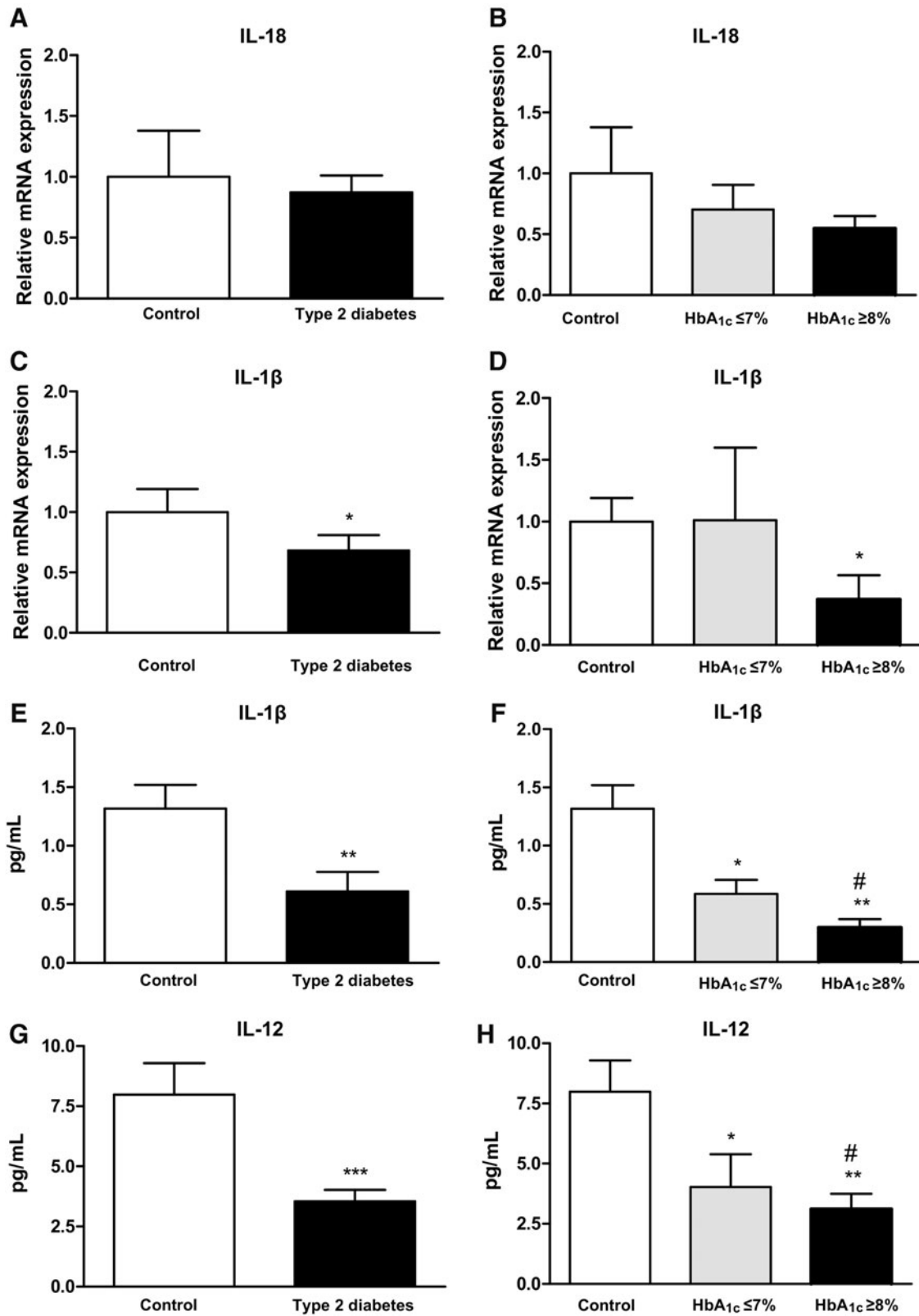


FIG. 3. IL expression in healthy subjects and diabetic patients. (A) Graph showing *IL-18* mRNA expression in controls and diabetic patients. (B) Graph showing *IL-18* mRNA expression in controls and diabetic patients separated by HbA_{1c}. (C) *IL-1β* mRNA expression in controls and diabetic patients. (D) *IL-1β* mRNA expression in controls and diabetic patients separated by HbA_{1c}. (E) Serum levels of IL-1β in controls and diabetic patients. (F) Serum levels of IL-1β in controls and diabetic patients separated by HbA_{1c}. (G) Serum levels of IL-12 in controls and diabetic patients. (H) Serum levels of IL-1β in controls and diabetic patients separated by HbA_{1c}. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; and ****p* < 0.001 when compared with control volunteers. #*p* < 0.05 with respect to HbA_{1c} ≤ 7% T2D patients. IL, interleukin.

can also be inhibited by β -hydroxybutyrate or a ketogenic diet, which also inhibits caspase-1 activation and IL-1 β secretion in animal models of inflammation (9). Another mediator that inhibits the NLRP3 inflammasome is IL-10. In fact, IL-10 has demonstrated an anti-inflammatory effect by metabolic reprogramming of macrophages and can inhibit glycolytic flux, prevent accumulation of dysfunctional mitochondria *via* induction of mitophagy, promote induction of autophagy, and maintain mitochondrial function and integrity *via* inhibition of mammalian target of rapamycin.

In accordance with NLRP3 inflammasome inhibition in leukocytes from diabetic patients, we have observed a decrease in *IL-1 β* gene expression in these cells and IL-1 β serum levels, an effect that was more pronounced in subjects with poor metabolic control. In addition, levels of IL-12 and caspase-1 decreased to a greater extent in diabetic patients with poor glycemic control, suggesting severe dysregulation of the immune response. Reduction in these levels of proinflammatory cytokines and caspase-1 suggests a downregulation of the NLRP3 inflammasome, which is in line with the known susceptibility of diabetic patients to infections. Furthermore, impairment of the release of proinflammatory cytokines has been described in animal models of diabetes with concomitant infections.

Overall, our findings suggest an increase in total and mitochondrial ROS production, impairment in NLRP3 inflammasome activation, and decrease in IL-1 β , IL-12, and caspase-1 in T2D patients. These trends are more pronounced in subjects with poor glycemic control, suggesting that glycemic control is essential for the adequate immune response of leukocytes in T2D. Although new mechanistic pathways need to be explored, we propose the possibility that poor glycemic control impairs the NLRP3 inflammasome response in T2D.

Notes

Subjects of the study and sample collection

One hundred one subjects were enrolled in the study and subdivided into two groups: 61 T2D patients (25 with HbA_{1c} levels $\leq 7\%$ and 36 with HbA_{1c} $\geq 8\%$) and 40 healthy controls adjusted for age. We have chosen to compare patients with good glycemic control, that is, with HbA_{1c} $\leq 7\%$ since it is the cutoff point for good metabolic control in our hospital's Endocrinology and Nutrition Department based on the distribution of HbA_{1c} levels in its patients and, moreover, this is a cutoff point for avoiding thromboembolism in patients. On the other hand, a poor glycemic control cutoff of HbA_{1c} $\geq 8\%$ has been chosen based on the increase in risk of cardiac failure in our hospital's Endocrinology and Nutrition Department.

The study was conducted in the Endocrinology and Nutrition Service of University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain. T2D diagnosis was confirmed according to the American Diabetes Association's criteria: levels of fasting serum glucose ≥ 126 mg/dL; HbA_{1c} $\geq 6.5\%$; random serum glucose ≥ 200 mg/dL on at least two occasions; and/or antidiabetic medication. Subjects with chronic, malignant, hematological, autoimmune, infectious, and inflammatory diseases or with a documented history of CVD (stroke, ischemic heart disease, and peripheral vascular disease, *etc.*) were excluded.

The present study was conducted according to ethical guidelines laid down in the Helsinki Declaration and with the approval of our hospital's Ethics Committee. All participants were informed about the procedure, risks, and benefits of the study before they signed an informed consent form.

Clinical and biochemical determinations

Patients underwent a physical examination to obtain anthropometrical measures such as height (m), weight (kg), waist circumference (cm), BMI (kg/m²), and systolic and diastolic blood pressure (mmHg). Blood samples were collected from the antecubital vein in fasting conditions between 8:00 a.m. and 9:30 a.m. for biochemical and molecular determinations.

To obtain serum, centrifugation was performed at 1500g for 10 min at 4°C. TC, TG, and glucose levels were determined in the serum by means of enzymatic assay (Beckman Corp., Brea, CA). The percentage of HbA_{1c} was obtained with an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkray Inc., Kyoto, Japan). HDL-c concentration was quantified with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp.) and LDL-c concentration was calculated with Friedewald's formula. Fasting insulin levels were measured by immunochemiluminescence (Abbott, Abbott Park, IL) and HOMA-IR index was calculated as [fasting insulin (μ U/mL) \times fasting glucose (mg/dL)]/405. hs-CRP was measured by a latex-enhanced immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II; Dade Behring, Inc., Newark, DE).

Cell isolation

Leukocytes were isolated from heparinized blood samples by incubating whole blood samples with half a volume of dextran (3% w/v in saline solution, 45 min; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Supernatants were collected, placed over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and centrifuged at room temperature at 650g for 25 min. Leukocytes were collected from the bottom phase and centrifuged at room temperature at 650g for 10 min. The collected pellets were washed with phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich) and resuspended in Hank's balanced salt solution (Sigma-Aldrich), at which point cells were counted. Pellets for Western blot and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) were stored at -80°C until utilization.

Static cytometry assay

Total and mitochondrial ROS production in leukocytes was assessed with a fluorescence microscope (IX81; Olympus, Hamburg, Germany) coupled with the static cytometry software, ScanR (Olympus). Total ROS was determined by seeding leukocytes in a 48-well plate and incubating it with the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (5×10^{-6} mol/L, 30 min) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) or, for mitochondrial ROS production, using the fluorescent probe MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (MitoSOX) (5×10^{-6} mol/L, 30 min) (Thermo Fisher Scientific), and Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) was used to visualize nuclei. Fluorescence was standardized and referred to as % of control.

Real-time PCR

RT-qPCR was performed to measure relative gene expression of NLRP3, IL-1 β , caspase-1, and IL-18 in leukocytes. To obtain total RNA, a GeneAll Ribospin™ Total RNA extraction kit (GeneAll Biotechnology, Hilden, Germany) was employed following the manufacturer's instructions. RNA amount and purity were determined by a NanoDrop 200c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). For complementary DNA (cDNA) obtention, 1 μ g of RNA was reverse-transcribed by using a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR reactions were performed using a 7500 Fast RT-PCR system (Thermo Fisher Scientific) with FastStart Universal SYBR Green Master (Sigma-Aldrich).

The protocol used to perform the experiments was 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 60°C for 30 s, and melting curve. Analyzed genes were *NLRP3* (forward: CTCTCTGATGAGGCCCAAG; reverse: GCACGAAACTGGAAAGGAAG), *IL-1 β* (forward: AAAAGCTTGGTGATGTCT; reverse: TTTCAACACGCAGGACAGG), *caspase-1* (forward: TTTCAACACGCAGGACAGG; reverse: AGAAA GCCACATAGAGAAG), and *IL-18* (forward: GACCAAGGAAATCGCCTCT; reverse: AATATGGTCCGGGGTGCATT). Relative quantification was conducted according to the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (forward: CGCATCTTCTTTTGCCTCG; reverse: TTGAGGTCAATGAAGGGG TCA) was used as a housekeeping gene in the analysis performed with ExpressionSuite software (Thermo Fisher Scientific).

Western blot

Total protein extracts from leukocytes were obtained after lysis with an extraction buffer (20% glycerol, 20 mM HEPES pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 μ M Na₂-MoO₄, 400 mM NaCl, and 0.5% NP-40) containing protease inhibitors (1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 10 mM PNP, and 10 mM β -glycerol phosphate) and dithiothreitol 1 mM, after incubation for 15 min on ice and centrifugation at 4°C for 15 min. The isolated supernatant containing the protein extract was quantified by a BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific) and stored at -80°C until use.

To assay protein expression levels, protein samples (25 μ g) were resolved on 10% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-NLRP3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and anti-Actin (Sigma-Aldrich). As a secondary antibody, we used horseradish peroxidase goat anti-rabbit (Millipore Iberica, Madrid, Spain). Membranes were developed with ECL Plus reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) or SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific). The Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) was used for band visualization. Signals were analyzed, quantified by densitometry using BioID software (Vilbert Lourmat), and normalized for actin.

Assessment of cytokines

MILLIPLEX® human high-sensitivity T cell magnetic bead panel 96-well plate assay (EMD Millipore Corporation,

Billerica, MA) coupled with multianalyte profiling (xMAP) technology was used to determine serum levels of the proinflammatory cytokines, IL-1 β and IL-12 (p70), in a Luminex 200™ system (Luminex Corp., Austin, TX). Assay was performed following technical guidelines provided in the kit. All analytes were measured simultaneously in the same serum sample and assayed in duplicate, with intra-assay % coefficient of variation <5% and interassay % coefficient of variation <15% for each analyte.

Data analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 17.0 software (SPSS Statistics, Inc., Chicago, IL). Values are expressed as mean \pm standard deviation for parametric data and as median (25th and 75th percentiles) for nonparametric data. Bar graphs show mean + standard error. Comparisons between groups were performed by Student's *t*-test for normally distributed samples and Mann-Whitney *U*-test for non-normally distributed samples. Chi-square test was employed to compare proportions. The three groups were compared with one-way analysis of variance (and Student-Newman-Keuls *post hoc* test) or Kruskal-Wallis test (and Dunn's multiple comparison *post hoc* test) for parametric and nonparametric data, respectively. Correlations were calculated using Spearman's correlation coefficient. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Acknowledgments

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance and Rosa Falcón and Carmen Ramirez (FISABIO) for their technical assistance. This study was financed by grants PI16/1083, PI16/0301, and CIBERehd CB06/04/0071 from the Carlos III Health Institute and the European Regional Development Fund (ERDF "A way to build Europe"), UGP-15-220 from FISABIO, and unrestricted grant from Menarini S.A. F.I is a recipient of a contract from the Ministry of Education of the Valencian Regional Government (GRISOLIAP/2016/015). N.D.-M. is a recipient of PFIS contracts from the Carlos III Health Institute (FI14/00125). I.E.-L. is a recipient of a predoctoral contract from FISABIO (UGP-15-144). S.R.-L. is a recipient of a Juan de la Cierva-Formación contract from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FJCI-2015-25040). V.M.V. and M.R. are recipients of contracts from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government and Carlos III Health Institute (CES10/030 and CPII16/00037, respectively).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests relevant to this article exist. The authors have nothing to disclose.

References

1. De Nardo D and Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol* 32: 373–379, 2011.
2. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Banuls C, Bellod L, de Pablo C, Alvarez A, Roldan-Torres I,

- Sola-Izquierdo E, and Victor VM. Human leukocyte/ endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* 36: 1695–1702, 2013.
3. Kousathana F, Georgitsi M, Lambadiari V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dimitriadis G, and Mouktaroudi M. Defective production of interleukin-1 beta in patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by proper glycemic control. *Cytokine* 90: 177–184, 2017.
 4. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehlers JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, and Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356: 1517–1526, 2007.
 5. Rovira-Llopis S, Apostolova N, Banuls C, Muntane J, Rocha M, and Victor VM. Mitochondria, the NLRP3 inflammasome, and sirtuins in type 2 diabetes: New therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal* 2018 [Epub ahead of print]; DOI:10.1089/ars.2017.7313.
 6. Rovira-Llopis S, Banuls C, Apostolova N, Morillas C, Hernandez-Mijares A, Rocha M, and Victor VM. Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal* 21: 1759–1765, 2014.
 7. Traba J, Kwarteng-Siaw M, Okoli TC, Li J, Huffstutler RD, Bray A, Waclawiw MA, Han K, Pelletier M, Sauve AA, Siegel RM, and Sack MN. Fasting and refeeding differentially regulate NLRP3 inflammasome activation in human subjects. *J Clin Invest* 125: 4592–4600, 2015.
 8. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, and Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 12: 408–415, 2011.
 9. Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, D'Agostino D, Planavsky N, Lupfer C, Kanneganti TD, Kang S, Horvath TL, Fahmy TM, Crawford PA, Biragyn A, Alnemri E, and Dixit VD. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med* 21: 263–269, 2015.

Address correspondence to:

Dr. Victor M. Victor
 Service of Endocrinology and Nutrition
 University Hospital Doctor Peset
 Foundation for the Promotion of Health and Biomedical
 Research in the Valencian Region (FISABIO)
 Avda Gaspar Aguilar 90
 Valencia 46017
 Spain

E-mail: victor.victor@uv.es

Date of first submission to ARS Central, May 30, 2018; date of acceptance, June 1, 2018.

Abbreviations Used

BMI	= body-mass index
CARD	= caspase recruitment domain
cDNA	= complementary DNA
CVD	= cardiovascular disease
HbA _{1c}	= glycated hemoglobin
HDL-c	= high-density lipoprotein cholesterol
HOMA-IR	= homeostasis model assessment of insulin resistance
hs-CRP	= high-sensitivity C-reactive protein
IL	= interleukin
LDL-c	= low-density lipoprotein cholesterol
MitoSOX	= MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator
mRNA	= messenger RNA
NLRP3	= NOD-like receptor family protein 3
ROS	= reactive oxygen species
RT-qPCR	= quantitative real-time polymerase chain reaction
T2D	= type 2 diabetes
TC	= total cholesterol
TGs	= triglycerides



Article

The SGLT2 Inhibitor Empagliflozin Ameliorates the Inflammatory Profile in Type 2 Diabetic Patients and Promotes an Antioxidant Response in Leukocytes

Francesca Iannantuoni ¹, Aranzazu M. de Marañón ¹, Noelia Diaz-Morales ¹, Rosa Falcon ¹, Celia Bañuls ¹, Zaida Abad-Jimenez ¹, Victor M. Victor ^{1,2,3,*}, Antonio Hernandez-Mijares ^{1,4,5,*} and Susana Rovira-Llopis ^{1,*}

- ¹ Service of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; franian@alumni.uv.es (F.I.); arantxa.mmp@gmail.com (A.M.d.M.); noeliadm_89@hotmail.com (N.D.-M.); rosafalcon16@gmail.com (R.F.); celia.banuls@gmail.com (C.B.); zaijai@alumni.uv.es (Z.A.-J.)
- ² CIBERehd-Department of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain
- ³ Department of Physiology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain
- ⁴ Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain
- ⁵ Department of Medicine, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain
- * Correspondence: victor.victor@uv.es (V.M.V.); hernandez_antmij@gva.es (A.H.-M.); srovirallopis@gmail.com (S.R.-L.); Tel.: +34-961622757 (S.R.-L.); Fax: +34-961622492 (S.R.-L.)

Received: 20 September 2019; Accepted: 29 October 2019; Published: 1 November 2019



Abstract: Sodium–glucose co-transporter 2 inhibitors (iSGLT2) have been linked to a considerable reduction in cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes (T2D), but the precise molecular mechanisms are still elusive. We aimed to evaluate the effects of the iSGLT2 empagliflozin on systemic inflammation and its potential antioxidant properties. This is an observational, prospective follow-up study of a cohort of fifteen patients with T2D who received 10 mg/day of empagliflozin according to standard clinical care. Measures at baseline, 12 and 24 weeks were taken. Metabolic and anthropometric parameters were evaluated. Production of mitochondrial superoxide, glutathione content, and glutathione s-reductase and catalase mRNA levels were measured in leukocytes. Serum levels of myeloperoxidase, hs-CRP and IL-10 were determined. In addition to decreased body weight and reduced glucose and HbA1c levels, we observed a reduction in superoxide production in leukocytes of diabetic patients and increased glutathione content, prominently after 24 weeks of empagliflozin treatment. Leukocyte expression of glutathione s-reductase and catalase, and serum levels of IL-10 were enhanced at 24 weeks of empagliflozin treatment. Concomitantly, reduced hs-CRP and myeloperoxidase levels were seen. This study provides evidence of the antioxidant and anti-inflammatory properties of empagliflozin treatment in humans, which may contribute to its beneficial cardiovascular effects.

Keywords: empagliflozin; SGLT2 inhibitors; type 2 diabetes; oxidative stress; inflammation; leukocytes

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common chronic metabolic diseases, strongly associated with cardiovascular diseases, which account for up to 80% of deaths among the diabetic population, thus constituting a serious health problem [1–3]. The characteristic metabolic disturbances of T2D are insulin resistance, hyperglycaemia and altered lipid metabolism, which sustain a state of subacute chronic inflammation [4]. At the cellular level, these alterations lead to a shift in the balance between oxidants and antioxidants in favour of oxidants, such as superoxide, which is released mostly as

a by-product of mitochondrial oxidative phosphorylation [5]. Antioxidant defenses include many enzymes, such as glutathione s-reductase (GSR), involved in the reduction of glutathione disulphide to glutathione (GSH), or catalase (CAT), which dismutates H_2O_2 into H_2O and O_2 .

On the other hand, the systemic inflammation present in diabetic patients is mainly manifested by increased circulating pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha ($TNF\alpha$) or interleukin 1 beta ($IL-1\beta$), released by leukocytes [6]. These two main features of diabetes, namely, oxidative stress and chronic inflammation are of pivotal importance for diabetes-induced cardiovascular risk, and as such are key targets for therapy [7].

A key player in the multifactorial pathophysiology of diabetes is glucose reabsorption by the kidneys, which becomes maladaptive and markedly enhanced, thereby contributing to hyperglycaemia [8]. The sodium and glucose co-transporter 2 (SGLT2), located at the kidney proximal tubule, is the main driver of glucose transport from urine back into the bloodstream, accounting for at least ninety percent of filtered glucose [9]. Recently, major attention has been focused on a novel type of oral anti-diabetic drugs (OAD), the SGLT2 inhibitors (iSGLT2). iSGLT2 act directly on glucose without depending on β -cell function or insulin resistance [10]. Empagliflozin is one such iSGLT2, and is being widely used both as monotherapy or combined with insulin or other OADs, as its mechanism of action does not interfere with traditional antidiabetic medications [11]. In addition to their antihyperglycaemic effects, iSGLT2s have been shown to improve tissue insulin sensitivity [12,13], increase glucagon secretion by alpha cells in the pancreas [14], prevent obesity by reducing body weight [15], and decrease blood pressure [16]. Most importantly, a reduction in cardiovascular mortality attributed to iSGLT2 treatment has been demonstrated in diabetic patients, in which a combined effect of the aforementioned mechanisms may be critical [17,18]. However, the precise molecular basis for cardiovascular protection in patients treated with iSGLT2 eludes our understanding.

Given this scenario, the aim of the present study was to examine the metabolic outcomes of empagliflozin treatment in T2D patients, focusing on its chronic (24 weeks of treatment) effects on inflammatory and oxidative stress signaling.

2. Experimental Section

2.1. Patients and Sample Collection

This is a post-authorization, observational, prospective follow-up study of a cohort of patients with T2D. The T2D diagnosis was confirmed according to the American Diabetes Association's criteria [19].

Fifteen patients with T2D who received treatment with empagliflozin according to standard clinical care for T2D and who met the inclusion and exclusion criteria of the study were recruited from the Endocrinology Service (University Hospital Doctor Peset). Initially, 17 patients were included in the study, however, two were excluded due to lack of adherence to the treatment.

The inclusion criteria were as follows: age between 40 and 70 years of age and time of evolution of the disease greater than 10 years. Exclusion criteria were the following: significant renal impairment (creatinine >1.5 mg/dL or eGFR < 60 mL/min/1.73 m²); severe diabetic neuropathy; chronic diseases other than those directly related to cardiovascular risk; morbid obesity (BMI > 40 kg/m²); smoking habit or habitual alcohol intake. Patients were also excluded if other hypoglycaemic, antihypertensive or lipid-lowering treatment had been altered (changes in dose or type of drug) in the previous year or during the study period. The treatment consisted of 10 mg/day of empagliflozin for 24 weeks taken orally, and measurements were taken at baseline and at 12 weeks and 24 weeks. Given the safety and tolerability of empagliflozin [20] in patients with type 2 diabetes, and the efficacy demonstrated in large-scale clinical trials [17,18], the dose of 10 mg/day was chosen. Urinary tract infections and genital infections are the most common side effects for iSGLT2 treatment, and none of the subjects developed any of these conditions in the study period.

The study was performed in compliance with the statement of ethical principles for medical research of the Declaration of Helsinki and approval was obtained from our hospital's Ethics Committee

(CEIC 30/17) for all procedures involving human subjects. Informed written consents were obtained from all patients before their participation.

2.2. Anthropometric and Biochemical Analyses

During each visit patients underwent a physical examination to obtain anthropometrical measurements such as weight (kg), height (m), waist circumference (cm), systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP, mmHg). Overnight fasting blood was collected from the antecubital vein between 8:00 a.m. and 9:30 a.m. Samples were centrifuged at 1500 g for 10 min at 4 °C to obtain serum for biochemical and molecular determinations.

Glucose levels were measured using enzymatic techniques and a Dax-72 autoanalyzer (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY, USA). Fasting insulin levels were quantified by immunochemiluminescence (Abbott, Madrid, Spain). Homeostasis model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR) was estimated as (fasting insulin ($\mu\text{U/mL}$) \times fasting glucose (mg/dL))/405. The percentage of HbA1c was obtained with an automatic glycohaemoglobin analyzer (Arkray Inc., Kyoto, Japan).

The lipid profile was analysed as follows: total cholesterol and triglyceride levels were obtained by means of enzymatic assay, high-density lipoprotein concentration (HDL-c) was determined with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., Brea, CA, USA), and low-density lipoprotein concentration (LDL-c) was calculated with Friedewald's formula. High sensitive C-reactive protein (hs-CRP) concentration was assessed by latex-enhanced immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II—Dade Bering, Inc., Newark, DE, USA).

2.3. Leukocyte Extraction

Blood collected in heparinized tubes was incubated for 45 min with dextran (3% *w/v* in saline solution; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A gradient centrifugation was performed by placing collected supernatants on Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and centrifuging them at 650 g for 25 min at room temperature. A bottom phase containing leukocytes was collected and centrifuged at 650 g for 10 min at room temperature. The pellets were collected, washed with phosphate buffered saline (PBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pellets were counted and divided into aliquots and used fresh or stored at -80 °C until utilization.

2.4. Superoxide Production and GSH Content

MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator—MitoSOX™—(MTX, 5×10^{-6} mol/L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, (Massachusetts), USA) was employed to evaluate mitochondrial superoxide oxidation, and CellTracker™ Green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA, 1×10^{-6} mol/L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, (Massachusetts), USA) was used to assess GSH content. After extraction, 1.5×10^5 of fresh isolated leukocytes were seeded per well in 48-well plates and incubated with the corresponding fluorescent probes for 30 min. Cells from each subject were seeded in triplicate and 12 images per well were recorded. Fluorescence was analyzed with a fluorescence microscope (IX81; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) coupled with the static cytometry software "ScanR" (Olympus). In order to visualize nuclei, we coupled both fluorochromes with Hoechst 33342 (4×10^{-6} mol/L, Sigma Aldrich, St. Louis (Missouri), USA).

Fluorescence was standardized and referred to as percentage of control.

2.5. Quantitative Analysis of GSR and CAT Gene Expression

Total RNA was extracted from the pellet of leukocytes using GeneAll Ribospin™ Total RNA extraction kit (Geneall Biotechnology, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis was carried out using FastStart Universal SYBR Green Master (Sigma Aldrich, St. Louis (Missouri), USA) and the 7500 Fast RT-PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The purity and concentration of the RNA in samples was ascertained and

calculated using a NanoDrop 200c spectrophotometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) at an absorbance of 260 nm/280 nm (A260/280).

First strand cDNA was attained by means of a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). qRT-PCR reactions were carried out as follows: 10 min at 95 °C, 40 cycles (designed in one step) at 95 °C for 10 s and one cycle at 60 °C for 30 s, and a melting curve stage.

Primers used for the study of mRNA expression of GSR were: Forward, GTGGAGGTGCTG AAGTTCTCC and Reverse, AACCATGCTGACTTCCAAGC; and for CAT were: Forward, CTTC GACCCAAGCAACATGC and Reverse, CGGTGAGTGTGTCAGGATAGGC. Data were normalized to GAPDH by using the primers: Forward, CGCATCTTCTTTGCGTCG and Reverse, TTGAGG TCAATGAAGGGGTCA. Relative quantification was carried out according to the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data were analyzed with Expression Suite software (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific).

2.6. Myeloperoxidase (MPO) and Interleukin 10 (IL-10) Levels

MPO and IL-10 levels were evaluated in serum using a Luminex 200 flow analyzer system (Millipore, Austin, TX, USA).

2.7. Statistical Analysis

GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com) was employed for statistical analysis. Parametric data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) and non-parametric variables as median (25th and 75th percentiles). Bar graphs show mean \pm standard error of the mean (SEM). The three groups were subjected to repeated measure one-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test or the Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons test for parametric and non-parametric data. When only 2 groups were compared, a paired t-test was employed.

Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Anthropometric and Biochemical Parameters

The present study involved 15 diabetic subjects who initiated treatment with empagliflozin according to the standard clinical care for T2D. Among these patients, five were on treatment with metformin, one with insulin, four with metformin + DPP-4 inhibitors, two with metformin + DPP-4 inhibitors + insulin, two with metformin + insulin, and one patient received empagliflozin as monotherapy. However, all patients had received stable glucose-lowering therapy for at least 12 months before the study and continued to do so during follow-up; hence, empagliflozin treatment was the only substantial change in their treatment. With regard to lipid-lowering drugs, 80% of patients received statins. A total of nine patients took antihypertensive medications, five of which with diuretic treatment. Retinopathy and nephropathy affected 20% and 33% of T2D patients, respectively.

Anthropometric and metabolic characteristics of the study group are shown in Table 1. We observed a significant decrease in weight after 12 weeks of empagliflozin treatment ($p < 0.05$), and a further decrease at 24 weeks of treatment ($p < 0.05$ compared to baseline, and also between 12 and 24 weeks), together with a marked reduction in waist circumference ($p < 0.01$ between baseline and 24 weeks). Systolic and diastolic blood pressure remained unchanged during the follow-up period.

Table 1. Anthropometric parameters of the study population at baseline, 12 weeks and at the end of 24-week follow-up.

	Baseline	12 Weeks Empagliflozin	24 Weeks Empagliflozin	<i>p</i> -Value
<i>N</i> (males)	15 (11)	15 (11)	15 (11)	
Age (years)	60.8 ± 10.2	-	-	
Weight (kg)	88.1 ± 19.8	85.1 ± 20.2 *	83.7 ± 20.4 **	<0.001
Waist circumference (cm)	104.4 ± 12.4	100.9 ± 15.6	98.22 ± 13.0 **	<0.05
SBP (mmHg)	139.3 ± 25.9	137.3 ± 20.9	139.3 ± 21.2	ns
DBP (mmHg)	77.2 ± 11.6	79.1 ± 13.3	77.0 ± 12.5	ns
Total cholesterol (mg/dL)	141 ± 25	155 ± 28 *	150 ± 27	<0.05
LDL-c (mg/dL)	79.5 ± 18.6	89.2 ± 17.0	86.7 ± 20.4	ns
HDL-c (mg/dL)	44.6 ± 7.8	42.8 ± 6.9	47.0 ± 3.9	ns
Triglycerides (mg/dL)	94 (86–137)	119 (101–171) *	108 (85–130)	<0.05
Insulin (μUI/mL)	9.6 ± 5.7	9.3 ± 5.8	9.2 ± 6.1	ns
HOMA-IR	3.28 ± 2.23	3.00 ± 1.63	2.83 ± 1.96	ns

¹ Data are expressed as mean ± SD for parametric variables and as median (interquartile range) for non-parametric data. Repeated measure one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test or Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons test were performed when comparing parametric and non-parametric variables, respectively. * *p* < 0.05 vs. baseline, ** *p* < 0.01 vs. baseline, # *p* < 0.05 vs. 12 weeks-empagliflozin. Abbreviations: SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

Regarding lipid profile, our data showed a modest increase in total cholesterol at 12-weeks of empagliflozin treatment (*p* < 0.05), but this increase was not maintained at 24-weeks, though levels were still higher than at baseline. LDL-c and HDL-c levels increased slightly, but did not show significant differences after treatment. Triglyceride levels increased transiently at 12 weeks of treatment (*p* < 0.05). Lastly, when we analyzed insulin levels and HOMA-IR index, no differences from baseline were noted after treatment with empagliflozin. Patients whose treatment included insulin were excluded from HOMA-IR and insulin assessments. As expected, glucose levels decreased with empagliflozin treatment and became significant at 24-weeks of treatment (*p* < 0.05; Figure 1A). We observed the same pattern in HbA_{1c} % (*p* = 0.09 at 12-weeks and *p* < 0.05 at 24-weeks treatment; Figure 1B).

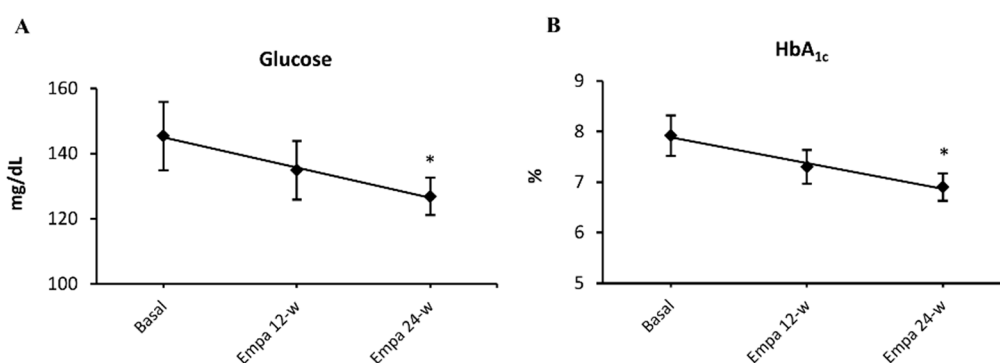


Figure 1. Empagliflozin effect on glucose metabolism. Blood glucose (A) and HbA_{1c} levels (B) at 12 and at 24 weeks of treatment with empagliflozin 10 mg/day. Abbreviations: EMPA, empagliflozin; HbA_{1c} %, glycated hemoglobin. * *p* < 0.05 vs. type 2 diabetes baseline.

3.2. Mitochondrial Superoxide Production and GSH Content in Leukocytes

Data showed a tendency (*p* = 0.059) to produce less mitochondrial superoxide after 12 weeks, a value that became statistically significant after 24 weeks (*p* < 0.05; Figure 2A) and is indicative of a reduction in oxidative stress.

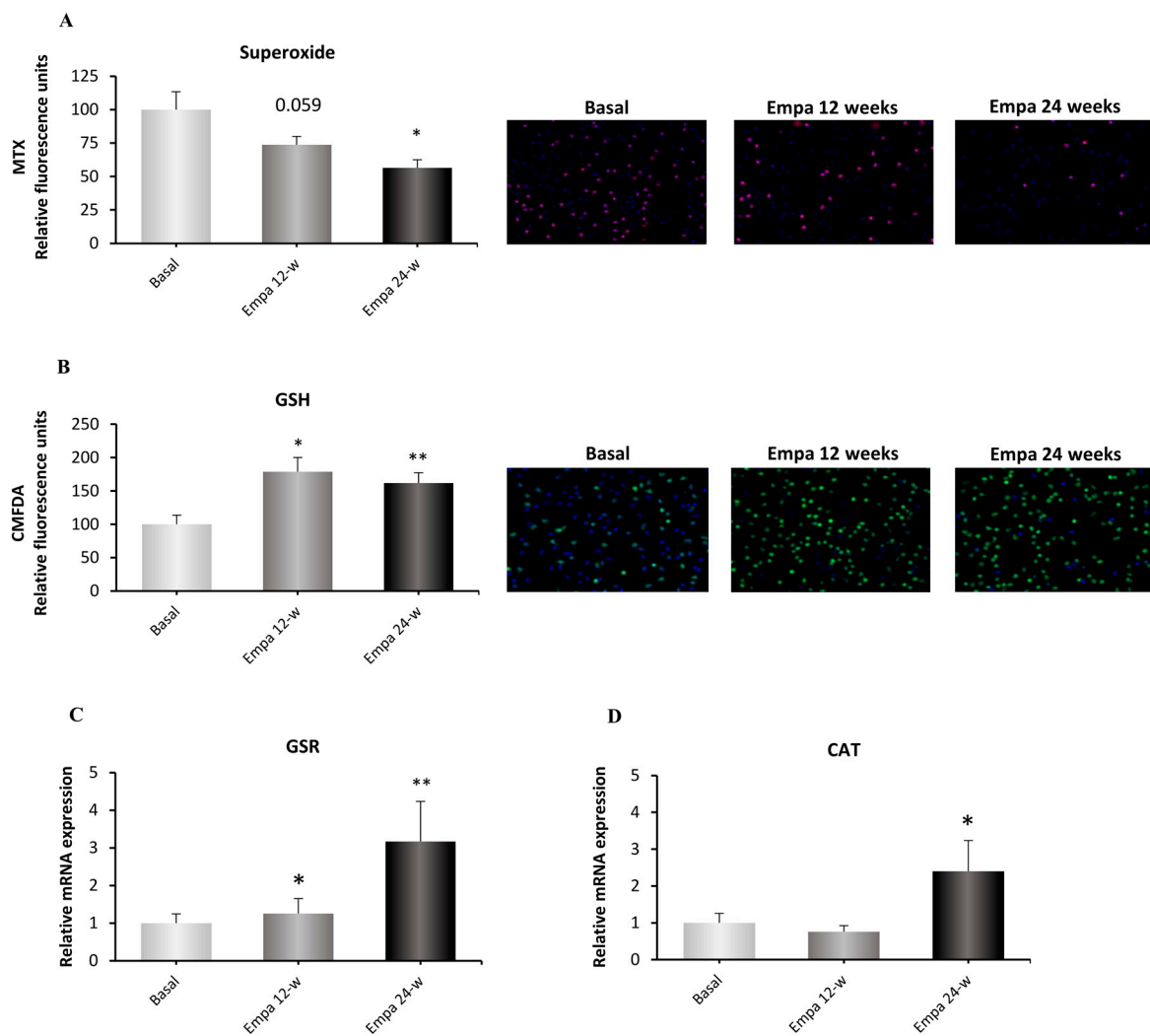


Figure 2. Effect of empagliflozin treatment on oxidative stress parameters and antioxidant enzymes. Mitochondrial superoxide production (A), GSH content (B) and mRNA expression of the antioxidant enzymes GSR (C) and CAT (D) in human leukocytes at 12 and 24 weeks of empagliflozin treatment. Data were normalized to fluorescence at baseline. The values of the relative gene expression were normalized to baseline mRNA expression levels and calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Abbreviations: EMPA, empagliflozin; MTX, MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; GSH, glutathione, GSR, glutathione S-reductase; CAT, catalase. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ vs. type 2 diabetes baseline. Representative fluorescence microscopy images are shown.

GSH content, an endogenous antioxidant, increased significantly after 12 weeks of treatment ($p < 0.05$) and this trend was maintained after 24 weeks ($p < 0.01$; Figure 2B). Despite this antioxidant marker improvement, plasma carbonyl content did not change after either 12 or 24 weeks of empagliflozin treatment (data not shown).

3.3. Antioxidant Gene Expression

Besides GSH content, we evaluated GSR gene expression, which codifies for the enzyme involved in GSH synthesis. As shown in Figure 2C, GSR levels increased significantly after 24 weeks of treatment ($p < 0.05$) compared to baseline. The same pattern was observed for the mRNA expression of CAT, another key antioxidant enzyme, which augmented in a significant manner after 24 weeks of treatment ($p < 0.05$; Figure 2D).

3.4. Inflammatory Parameters

Because the main effects of empagliflozin on metabolism and oxidative stress were evident at 24 weeks of treatment, we focused on inflammatory markers at this time point. Analyzing the pro-inflammatory markers hs-CRP and MPO, we observed a significant decrease in both markers after treatment (both $p < 0.05$; Figure 3A,B). In terms of the anti-inflammatory cytokine IL-10, we observed a significant increase in its levels following treatment ($p < 0.05$; Figure 3C).

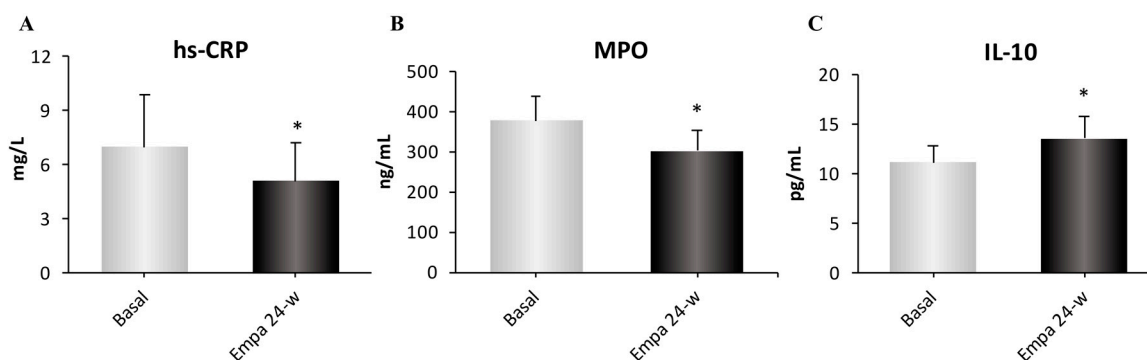


Figure 3. Assessment of inflammatory parameters; serum hs-CRP (A), MPO (B) and IL-10 (C) levels at baseline, 12 and 24 weeks of treatment. Abbreviations: EMPA, empagliflozin; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; MPO, myeloperoxidase; IL-10, interleukin 10. * $p < 0.05$ compared with type 2 diabetes baseline.

4. Discussion

iSGLT2s are a new class of oral hypoglycaemic drugs that block glucose reabsorption at the renal level, thus promoting urine glucose and sodium excretion and reducing plasma glucose levels [21]. In the present study, we have focused on the effects of empagliflozin on oxidative stress in the leukocytes of T2D subjects, and on inflammatory parameters. In addition to a reduction in body weight and an improved metabolic profile—characterized by reduced plasma glucose and HbA1c levels—we observed a reduction in mitochondrial superoxide production in diabetic patients after treatment with the iSGLT2 empagliflozin, together with increased antioxidant defenses. Moreover, reduced proinflammatory markers and increased anti-inflammatory parameters were maintained after 24 weeks of treatment with empagliflozin. Besides their glucose-lowering effect, iSGLT2s produce changes in the lipid profile that should also be highlighted. Empagliflozin treatment is correlated with increased total cholesterol due to slight increases in HDL-c and LDL-c, as we have observed, and reported in other studies [22,23]. However, there is a well-documented cardiovascular protection exerted by iSGLT2s, which endows these drugs with clinical potential [24]. This has been reflected by several studies, such as the EMPA-REG OUTCOME study [25] in which a reduction of 38% in cardiovascular mortality was evident in the empagliflozin vs. placebo group. However, neither the reduction in HbA1c observed in the study (0.60% over 12 weeks) nor the reduction in SBP (up to 5 mmHg) are sufficient to explain the reported protection against cardiovascular mortality [26,27].

Interestingly, as little as 24 weeks of treatment with iSGLT2 is sufficient to witness their beneficial effects on HbA1c, body weight, blood pressure and, most importantly, on the cardiovascular system [28]. As an example, the reduction in hospitalization rates for heart failure in the group treated with empagliflozin in the EMPA-REG OUTCOME study was already significant at this time point [25]. A recent study demonstrated an improved arterial stiffness after 6 weeks of treatment with empagliflozin in T2D patients, and hs-CRP was shown to be one of the main significant determinants for this improvement [29]. Nevertheless, despite the available evidence, the molecular mechanisms underlying the cardiovascular protection attributable to iSGLT2 treatment are still unknown, though amelioration of oxidative stress has been hypothesized to be a potential contributor [30]. Because cardiac tissue

possesses low antioxidant defenses, increasing the expression or activity of antioxidant enzymes could be a mechanism of cardiac protection under high risk situations such as T2D.

Oxidative stress occurs when the production of pro-oxidant species overcomes the intrinsic antioxidant defense system of the cell, thus triggering damage to lipids, proteins and DNA, and eventually compromising cellular and tissue function. Exploring the role of SGLT2 inhibition in the prevention or reduction of oxidative stress conditions has been the subject of several studies over the last decade. However, to date, most of the studies evaluating the effect of iSGLT2 on oxidative stress have been performed in animal models [31–33].

Our data demonstrate that T2D patients receiving iSGLT2 treatment undergo a reduction in mitochondrial superoxide production in parallel to an increase in glutathione content, and markedly so after 24 weeks of treatment. This is accompanied by increased expression of the antioxidant enzymes GSR and CAT. However, no changes in plasma protein carbonyl content were observed with empagliflozin treatment at these time-points. Whether this could be due to the small sample size or would require long-term empagliflozin treatment needs to be addressed in future research. Our findings are in accordance with previous studies in rat models of T2D, in which increased antioxidant enzyme content [32] and activity [33] in renal tissues has been reported. Furthermore, iSGLT2 treatment in diabetic mice has been shown to induce antioxidant gene expression (manganese-dependent superoxide dismutase and CAT) in adipose tissue and muscle [34].

Our study provides consistent and novel evidence of the antioxidant effect of empagliflozin treatment in humans. In this regard, one study showed that dapagliflozin, another iSGLT2, promoted a reduction in urinary isoprostane excretion, an indirect marker of oxidative stress, although this effect was acute (2 days of dapagliflozin treatment) and chronic effects were not evaluated [35]. Regarding empagliflozin, a previous study in patients with T2D showed that the use of empagliflozin was associated with a reduction in oxidative stress, although the study's duration was rather short (28 days). Moreover, changes were evident in a single marker of oxidative stress—namely, the urinary excretion of 8-iso-prostaglandin F_{2α}—but neither reactive oxygen species production nor antioxidant content were studied in cells isolated from such patients [36]. We have focused our study on immune cells, which are key players in the context of metabolic diseases, and particularly in T2D [6]. Circulating leukocytes participate in the maintenance of a chronic low-grade inflammatory state that is ongoing during T2D and could be one of the main causes of increased cardiovascular risk in these patients. Moreover, T2D patients are characterized by increased circulating proinflammatory cytokines and decreased anti-inflammatory IL-10, with these molecules being released by leukocytes [37–39]. We observed decreased inflammation following 24 weeks of empagliflozin treatment, evidenced by a drop in circulating hs-PCR. In addition, serum myeloperoxidase concentration was also markedly reduced by iSGLT2. This pro-oxidant enzyme is mainly released by neutrophils as an anti-microbial response, but enhanced levels have been observed during chronic inflammatory situations, and may trigger damage to the vascular walls [40,41]. We have previously demonstrated higher levels of myeloperoxidase in T2D patients, especially in those with vascular complications [42].

The present study, indicates that myeloperoxidase levels are reduced with empagliflozin, suggesting that this may be the way in which empagliflozin prevents the oxidative damage to the endothelium that precedes many of the complications of diabetes. We observed a concomitant increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 after 24 weeks of empagliflozin treatment. This finding supports an anti-inflammatory role of iSGLT2, which could contribute to preserving the vascular system in T2D patients. Recently, an ex vivo study demonstrated that SGLT2 inhibition prevents the hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasodilatation [43]. In accordance with these potential benefits to the vascular system, animal studies have shown that empagliflozin protects against vascular complications by undermining oxidative stress [31,44], which is reinforced by our present findings.

It is important to take into account that empagliflozin may decrease hs-CRP and reduce the levels of lipoproteins via ameliorating insulin resistance [45]. Therefore, the cardiovascular benefits conferred

by empagliflozin might be driven at least partly by anti-inflammatory effects, and this mechanism might cooperate with reduced blood pressure, also observed under empagliflozin treatment [45]. The underlying mechanisms to explain empagliflozin-induced anti-inflammatory effects are multiple, but may involve weight loss, a reduction in adipose tissue inflammation, a slight increase in ketone bodies, and diminution of uric acid levels or attenuation of oxidative stress [46].

5. Conclusions

In summary, this study provides new evidence of the antioxidant and anti-inflammatory properties of empagliflozin treatment in humans. These benefits may play a role in the well documented cardiovascular protection provided by iSGLT2, although the precise underlying mechanisms require further investigation.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.V. and S.R.-L.; Data curation, F.I., A.M.d.M., N.D.-M., R.F., C.B. and S.R.-L.; Formal analysis, F.I., A.M.d.M., N.D.-M., C.B., Z.A.-J. and S.R.-L.; Funding acquisition, V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.; Investigation, F.I., A.M.d.M., R.F., A.H.-M. and S.R.-L.; Methodology, S.R.-L.; Project administration, V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.; Resources, V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.; Supervision, V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.; Validation, V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.; Visualization, F.I., C.B. and Z.A.-J.; Writing—original draft, F.I., V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.; Writing—review & editing, F.I., A.M.d.M., N.D.-M., R.F., C.B., Z.A.-J., V.M.V., A.H.-M. and S.R.-L.

Funding: This study was financed by grants from “Carlos III Health Institute (ISCIII) [PI16/1083, PI18/00932, PI19/00838, CIBERehd CB06/04/0071, FI17/00126, FI14/00125, FI17/00144, CES10/030]”, by “Ministry of Education of the Valencian Regional Government [GRISOLIAP/2016/015]”, also by “Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [PTA2017-14355I]” and by the “European Regional Development Fund [ERDF “A way to build Europe”]”, and by an “unrestricted grant from Menarini S.A.”.

Acknowledgments: We thank Brian Normanly for his editorial assistance (CIBERehd/University of Valencia).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Lahnwong, S.; Chattipakorn, S.C.; Chattipakorn, N. Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. *Curr. Diabetol.* **2018**, *17*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gaede, P.; Lund-Andersen, H.; Parving, H.H.; Pedersen, O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 580–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mozaffarian, D.; Benjamin, E.J.; Go, A.S.; Arnett, D.K.; Blaha, M.J.; Cushman, M.; Das, S.R.; de Ferranti, S.; Després, J.P.; Fullerton, H.J.; et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics—2016 update: A report from the American heart association. *Circulation* **2016**, *133*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Saltiel, A.R.; Olefsky, J.M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Bellod, L.; De Pablo, C.; Alvarez, A.; Roldan-Torres, I.; Sola-Izquierdo, E.; Victor, V.M. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1695–1702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lackey, D.E.; Olefsky, J.M. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 15–28. [[CrossRef](#)]
7. Burgos-Morón, E.; Abad-Jiménez, Z.; Marañón, A.M.; Iannantuoni, F.; Escribano-López, I.; López-Domènech, S.; Salom, C.; Jover, A.; Mora, V.; Roldan, I.; et al. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1385. [[CrossRef](#)]
8. DeFronzo, R.A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* **2009**, *58*, 773–795. [[CrossRef](#)]
9. Anders, H.J.; Davis, J.M.; Thurau, K. Nephron protection in diabetic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2096–2098. [[CrossRef](#)]
10. Wright, E.M. Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2001**, *280*, F10–F18. [[CrossRef](#)]

11. Abdul-Ghani, M.A.; Norton, L.; Defronzo, R.A. Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 515–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ferrannini, E.; Muscelli, E.; Frascerra, S.; Baldi, S.; Mari, A.; Heise, T.; Broedl, U.C.; Woerle, H.J. Metabolic response to sodium glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 499–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Merovci, A.; Solis-Herrera, C.; Daniele, G.; Eldor, R.; Fiorentino, T.V.; Tripathy, D.; Xiong, J.; Perez, Z.; Norton, L.; Abdul-Ghani, M.A.; et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 509–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bonner, C.; Kerr-Conte, J.; Gmyr, V.; Gmyr, V.; Queniat, G.; Moerman, E.; Thévenet, J.; Beaucamps, C.; Delalleau, N.; Popescu, I.; et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 512–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ferrannini, G.; Hach, T.; Crowe, S.; Sanghvi, A.; Hall, K.D.; Ferrannini, E. Energy balance after sodium-glucose cotransporter 2 inhibition. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 1730–1735. [[CrossRef](#)]
16. Rajasekeran, H.; Lytvyn, Y.; Cherney, D.Z.I. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibition and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: The emerging role of natriuresis. *Kidney Int.* **2016**, *89*, 524–526. [[CrossRef](#)]
17. Wanner, C.; Inzucchi, S.E.; Zinman, B. Empagliflozin and progression of kidney disease in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1801–1802. [[CrossRef](#)]
18. Fitchett, D.; Inzucchi, S.E.; Cannon, C.P.; McGuire, D.K.; Scirica, B.M.; Johansen, O.E.; Sambevski, S.; Kaspers, S.; Pfarr, E.; George, J.T.; et al. Empagliflozin reduced mortality and hospitalization for heart failure across the spectrum of cardiovascular risk in the EMPA-REG OUTCOME trial. *Circulation* **2019**, *139*, 1384–1395. [[CrossRef](#)]
19. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care* **2019**, *42*, S13–S28. [[CrossRef](#)]
20. Kohler, S.; Zeller, C.; Iliev, H.; Kaspers, S. Safety and Tolerability of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes: Pooled Analysis of Phase I-III Clinical Trials. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 1707–1726. [[CrossRef](#)]
21. Sattar, N.; Petrie, M.C.; Zinman, B.; Januzzi, J.L., Jr. Novel diabetes drugs and the cardiovascular specialist. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *69*, 2646–2656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Monami, M.; Dicembrini, I.; Kundisova, L.; Zannoni, S.; Nreu, B.; Mannucci, E. A meta-analysis of the hypoglycaemic risk in randomized controlled trials with sulphonylureas in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2014**, *16*, 833–840. [[CrossRef](#)]
23. Häring, H.U.; Merker, L.; Seewaldt-Becker, E.; Weime, M.; Meinicke, T.; Broedl, U.C.; Woerle, H.J. EMPA-REG MET Trial Investigators. Empagliflozin as add-on to metformin in patients with type 2 diabetes: A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 1650–1659. [[CrossRef](#)]
24. Zelniker, T.A.; Wiviott, S.D.; Raz, I.; Im, K.; Goodrich, E.L.; Bonaca, M.P.; Mosenzon, O.; Kato, E.T.; Cahn, A.; Furtado, R.H.M.; et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet* **2019**, *393*, 31–39. [[CrossRef](#)]
25. Zinman, B.; Wanner, C.; Lachin, J.M.; Fitchett, D.; Bluhmki, E.; Hantel, S.; Mattheus, M.; Devins, T.; Johansen, O.E.; Woerle, H.J.; et al. Empagliflozin, Cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 2117–2128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Turnbull, F.M.; Abraira, C.; Anderson, R.J.; Byington, R.P.; Chalmers, J.P.; Duckworth, W.C.; Evans, G.W.; Gerstein, H.C.; Holman, R.R.; Moritz, T.E.; et al. Intensive glucose control and macrovascular outcomes in type 2 diabetes. *Diabetologia* **2009**, *52*, 2288–2298. [[CrossRef](#)]
27. Emdin, C.A.; Rahimi, K.; Neal, B.; Callender, T.; Perkovic, V.; Patel, A. Blood pressure lowering in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *JAMA* **2015**, *313*, 603–615. [[CrossRef](#)]
28. Dalama, B.; Mesa, J. New oral hypoglycemic agents and cardiovascular risk. Crossing the metabolic border. *Rev. Esp. Cardiol.* **2016**, *69*, 1088–1097. [[CrossRef](#)]
29. Bosch, A.; Ott, C.; Jung, S.; Striepe, K.; Karg, M.V.; Kannenkeril, D.; Dienemann, T.; Schmieder, R.E. How does empagliflozin improve arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus? Sub analysis of a clinical trial. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*, 44. [[CrossRef](#)]
30. Yaribeygi, H.; Atkin, S.L.; Butler, A.E.; Sahebkar, A. Sodium-glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: An update. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 3231–3237. [[CrossRef](#)]

31. Oelze, M.; Kröller-Schön, S.; Welschof, P.; Jansen, T.; Hausding, M.; Mikhed, Y.; Stamm, P.; Mader, M.; Zinßius, E.; Agdauletova, S.; et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Shin, S.J.; Chung, S.; Kim, S.J.; Lee, E.M.; Yoo, Y.H.; Kim, J.W.; Ahn, Y.B.; Kim, E.S.; Moon, S.D.; Kim, M.J.; et al. Effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, dapagliflozin, on renal renin-angiotensin system in an animal model of type 2 diabetes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Osorio, H.; Coronel, I.; Arellano, A.; Pacheco, U.; Bautista, R.; Franco, M.; Escalante, B. Sodium-glucose cotransporter inhibition prevents oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2012**, *2012*, 542042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sugizaki, T.; Zhu, S.; Guo, G.; Matsumoto, A.; Zhao, J.; Endo, M.; Horiguchi, H.; Morinaga, J.; Tian, Z.; Kadomatsu, T.; et al. Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality. *NPJ Aging Mech. Dis.* **2017**, *3*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Solini, A.; Giannini, L.; Seghieri, M.; Vitolo, E.; Taddei, S.; Ghiadoni, L.; Bruno, R.M. Dapagliflozin acutely improves endothelial dysfunction, reduces aortic stiffness and renal resistive index in type 2 diabetic patients: A pilot study. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Nishimura, R.; Tanaka, Y.; Koiwai, K.; Inoue, K.; Hach, T.; Salsali, A.; Lund, S.S.; Broedl, U.C. Effect of empagliflozin monotherapy on postprandial glucose and 24-h glucose variability in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled, 4-week study. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; de Marañón, A.M.; Diaz-Morales, N.; Jover, A.; Garzon, S.; Rocha, M.; Victor, V.M.; Hernandez-Mijares, A. Low testosterone levels are related to oxidative stress, mitochondrial dysfunction and altered subclinical atherosclerotic markers in type 2 diabetic male patients. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108*, 155–162. [[CrossRef](#)]
38. Van Exel, E.; Gussekloo, J.; de Craen, A.J.; Frölich, M.; Bootsma-Van Der Wiel, A.; Westendorp, R.G. Leiden 85 Plus Study. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: The Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* **2002**, *51*, 1088–1092. [[CrossRef](#)]
39. Tedgui, A.; Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 515–581. [[CrossRef](#)]
40. Baldus, S.; Heeschen, C.; Meinertz, T.; Zeiher, A.M.; Eiserich, J.P.; Münzel, T.; Simoons, M.L.; Hamm, C.W.; CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **2003**, *108*, 1440–1445. [[CrossRef](#)]
41. Victor, V.M.; Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Diaz-Morales, N.; Martinez de Marañón, A.; Rios-Navarro, C.; Alvarez, A.; Gomez, M.; Rocha, M.; Hernández-Mijares, A. Insulin resistance in PCOS patients enhances oxidative stress and leukocyte adhesion: Role of myeloperoxidase. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Rovira-Llopis, S.; Rocha, M.; Falcon, R.; de Pablo, C.; Alvarez, A.; Jover, A.; Hernandez-Mijares, A.; Victor, V.M. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid Redox Signal.* **2013**, *19*, 1452–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. El-Daly, M.; Pulakazhi Venu, V.K.; Saifeddine, M.; Mihara, K.; Kang, S.; Fedak, P.W.M.; Alston, L.A.; Hirota, S.A.; Ding, H.; Triggle, C.R.; et al. Hyperglycaemic impairment of PAR2-mediated vasodilation: Prevention by inhibition of aortic endothelial sodium-glucose-co-Transporter-2 and minimizing oxidative stress. *Vascul. Pharmacol.* **2018**, *109*, 56–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Steven, S.; Oelze, M.; Hanf, A.; Kröller-Schön, S.; Kashani, F.; Roohani, S.; Welschof, P.; Kopp, M.; Gödtel-Armbrust, U.; Xia, N.; et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 370–385. [[CrossRef](#)]
45. Hattori, S. Anti-inflammatory effects of empagliflozin in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*, 93. [[CrossRef](#)]
46. Hadjadj, S.; Rosenstock, J.; Meinicke, T.; Woerle, H.J.; Broedl, U.C. Initial Combination of Empagliflozin and Metformin in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2016**, *39*, 1718–1728. [[CrossRef](#)]





Article

Mitochondrial Alterations and Enhanced Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions in Type 1 Diabetes

Francesca Iannantuoni ¹, Aranzazu M. de Marañón ¹, Zaida Abad-Jiménez ¹, Francisco Canet ¹, Pedro Díaz-Pozo ¹, Sandra López-Domènech ¹, Carlos Morillas ¹, Milagros Rocha ^{1,2,*} and Víctor M. Víctor ^{1,2,3,*}

¹ Service of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain; franian@alumni.uv.es (F.I.); arantxa.mmp@gmail.com (A.M.d.M.); zaiaji@alumni.uv.es (Z.A.-J.); francisco.canet.1994@gmail.com (F.C.); pedrodps2@gmail.com (P.D.-P.); sandra.lopez@uv.es (S.L.-D.); carlos.morillas@uv.es (C.M.)

² CIBERehd—Department of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

³ Department of Physiology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: milagros.rocha@uv.es (M.R.); victor.victor@uv.es (V.M.V.)

Received: 21 May 2020; Accepted: 6 July 2020; Published: 8 July 2020



Abstract: Type 1 diabetes has been associated with oxidative stress. This study evaluates the rates of oxidative stress, mitochondrial function, leukocyte–endothelium interactions and adhesion molecules in type 1 diabetic patients. The study population consisted of 52 diabetic patients and 46 body-composition and age-matched controls. We assessed anthropometric and metabolic parameters, oxidative stress and mitochondrial function by evaluating reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial ROS production, mitochondrial membrane potential and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) expression in polymorphonuclear leukocytes from type 1 diabetic patients. In addition, we evaluated interactions between leukocytes and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and serum expression of adhesion molecules (P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1), proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF α) and myeloperoxidase (MPO). HbA_{1C} and glucose levels were higher in diabetic patients than in control subjects, as expected. Mitochondrial function was altered and leukocyte–endothelium interactions were enhanced in diabetic patients, which was evident in the increase in total and mitochondrial ROS production, higher mitochondrial membrane potential, enhanced leukocyte rolling and adhesion, and decreased rolling velocity. Furthermore, we observed an increase in levels of adhesion molecules P-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 in these subjects. In addition, type 1 diabetic patients exhibited an increase in proinflammatory mediators TNF α and MPO, and a decreased expression of SOD. The enhancement of leukocyte–endothelium interactions and proinflammatory markers correlated with glucose and HbA_{1C} levels. Mitochondrial alteration, oxidative stress, and enhanced leukocyte–endothelium interactions are features of type 1 diabetes and may be related to cardiovascular implications.

Keywords: type 1 diabetes; mitochondria; endothelium; inflammation; cardiovascular risk

1. Introduction

Mitochondrial dysfunction and cardiovascular events have been previously related to metabolic diseases such as obesity and diabetes. Furthermore, impaired mitochondrial energetics and oxidative damage have been implicated in cardiac dysfunction in obesity and diabetes [1–3], and a disruption of physiological reactive oxygen species (ROS) homeostasis may lead to the impairment of β -cell

function [4]. On the other hand, a regulated production of ROS can be beneficial, as it mediates different physiological processes [5], acting as a double-edged sword by modulating insulin signaling-required for insulin to exert its physiological action-while also playing a role in the pathogenesis of insulin resistance [3].

Cardiovascular disease (CVDs) and related macro- and microvascular disease are long-term complications of obesity and diabetes and, together with chronic diabetic renal disease, are the most important cause of morbi-mortality in patients with type 1 diabetes [6–9]. It has been estimated that the relative risk of CVDs in these patients is 10 times higher than in non-diabetics [7]. In this sense, it is important to highlight that one of the key factors in the development of CVDs is atherosclerosis. The atherosclerotic process is considered a chronic inflammatory disease characterized by accumulation of lipids, infiltration of leukocytes, proliferation of smooth muscle cells and deposition of connective tissue [10]. Furthermore, atherosclerotic lesions in type 1 diabetic patients are characterized by the involvement of multiple vessels, including the distal coronary artery, and severe stenosis [11]. The complex relationship between type 1 diabetes and CVDs is not fully understood. In fact, the longer duration of type 1 diabetes can promote CVDs through different pathophysiological pathways [7,12,13].

Peripheral polymorphonuclear leukocytes (PMNs) are one of the main types of inflammatory cells and can release ROS when activated, contributing to oxidative stress, inflammation and endothelial impairment. Eventually, oxidative stress is produced in the PMNs of insulin-resistant patients and is related to an impairment of mitochondrial function [14]. In agreement with this idea, PMNs could also be activated by glucose homeostasis variation, such as acute hyper- and hypoglycemia, and these variations can concur, generating advanced glycosylation-end products (AGEs) that promote cellular dysfunction and endothelial expression of several adhesion molecules, such as vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and selectins [15–17]. On the other hand, AGEs have been demonstrated in atherosclerotic lesions of diabetic patients [18]. Furthermore, it is important to stress that the onset of many CVDs is heralded by the movement and accumulation of leukocytes in the vessel wall [18], and that these processes are mediated by an interaction between the adhesion molecules expressed on leukocytes and/or endothelial cells [19].

Lastly, PMNs also play an important role by releasing high amounts of ROS from different sources, such as mitochondria and myeloperoxidase (MPO) [20–22], which are well known risk factors of CVDs. Furthermore, the association of oxidative stress and inflammation with type 1 diabetes is partially documented, while the role of oxidative stress in PMNs, leukocyte–endothelium interactions and endothelial dysfunction is still unclear. The purpose of the present study was to throw light on the relationship between mitochondrial dysfunction, leukocyte activation and, especially, the increase of leukocyte–endothelium interactions observed in type 1 diabetes.

2. Experimental Section

2.1. Patients and Sample Collection

Our study population was composed of 52 patients with type 1 diabetes diagnosis [23] and 46 healthy volunteers recruited from the Endocrinology and Nutrition Service at University Hospital Dr Peset (Valencia, Spain), and who were adjusted by sex and age. The subjects signed a written informed consent form and protocols were approved by our hospital's Ethics Committee for Clinical Investigation (ID: 98/19), in line with the ethical principles of the Helsinki declaration.

Exclusion criteria were: presence of any documented history of CVDs (ischemic cardiopathy, stroke, peripheral arteriopathy, or any other chronic disease related to cardiovascular risk); any severe condition including inflammatory, infectious, and autoimmune diseases or malignancies.

2.2. Clinical and Biochemical Analysis

All subjects recruited for the present study underwent a physical examination to obtain anthropometrical measurements such as weight (kg), height (m), waist circumference (cm), body mass index (BMI), and systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). Blood samples for biochemical and experimental procedures were collected from the antecubital vein between 8:00 and 9:30 a.m. in a fasting condition. To obtain serum, samples were centrifuged at 1.500 g at 4 °C, for 10 min. Glucose levels were determined by means of an automated enzymatic technique using a Beckman Synchron LX20 Pro analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and percentage of glycosylated hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) was obtained with an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkay Inc., Kyoto, Japan). Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and triglyceride levels were determined by means of an automated enzymatic technique (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was calculated with Friedewald's formula. Highly sensitive C-reactive protein (hs-CRP) concentration was calculated by latex-enhanced immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II; Dade Behring, Inc., Newark, NJ, USA).

2.3. Isolation of Leukocytes

To isolate human leukocytes, blood collected in citrated tubes was incubated for 45 min with dextran (3% w/v in saline solution; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A gradient centrifugation was performed by placing collected supernatants over Ficoll–Hypaque (GE Healthcare, Barcelona, Spain) and centrifuging at 650 g for 25 min at room temperature. Pellets containing PMNs were collected and washed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), resuspended in 1 mL of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were counted and divided into different aliquots: a first aliquot of 1.95×10^6 cells/mL was resuspended in HBSS to perform a fluorescent microscopy assay; a second aliquot of 1.2×10^6 cells/mL was resuspended in complete Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI; Biowest-bw, Nuaille, France) to perform leukocyte–endothelium interaction assays; the remaining cells were stored at -80 °C.

2.4. ROS Production and Mitochondrial Membrane Potential

Total and mitochondrial ROS production was evaluated by static fluorimetry using a fluorescence microscope (IX81; Olympus, Hamburg, Germany) coupled with the static cytometry software "ScanR" (Olympus, Hamburg, Germany). After extraction, 1.5×10^5 of fresh isolated PMNs were seeded per well in 48-well plates and incubated with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 5 μM), red mitochondrial superoxide indicator (MitoSOX, 5 μM) and tetramethylrhodaminemethylester (TMRM, 5 μM) fluorescent probes (Thermo Fisher Scientific, Needham, MA, USA) for 30 min to measure total and mitochondrial ROS production, and mitochondrial membrane potential, respectively. Hoechst 33,342 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was used to visualize nuclei. Results were expressed as % of the control.

2.5. Interaction and Adhesion Assays

Interaction and adhesion dynamics were explored using an ex vivo model which simulates human physiological conditions, with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S; Amstelveen, Netherlands) connected to a video camera (Sony Exware HAD; Koln, Germany) for visualization and a parallel plate flow-chamber system as described previously [24]. To recreate the human endothelium, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were extracted from umbilical cords donated by healthy volunteers. HUVEC primary cultures were cultured in EBM2 medium (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with Supplement Pack Endothelial Cell GM2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) on fibronectin-coated plastic coverslips (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) until confluence. To perform the assay, coverslips were placed on the bottom of the flow chamber and the leukocyte suspension—Obtained as described previously—Were perfused across the system at a

flow rate of 0.36 mL/min (physiological human rates) for 5 min. The whole experiment was recorded and leukocyte rolling flux, rolling velocity and adhesion were studied as usual [24].

2.6. Adhesion Molecule and Biomarkers of Inflammation

To better understand cell adhesion dynamics, levels of P-selectin, VCAM-1, ICAM-1 and selected mediators of inflammation interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and MPO were evaluated in the serum of participants using a Luminex 200 flow analyzer system (Millipore, Austin, TX, USA).

2.7. Quantitative Analysis of SOD and CAT Gene Expression

Total RNA from leukocyte pellets were isolated with GeneAll[®] RibospinTM kit (GeneAll Biotechnology, Hilden, Germany). RNA concentration was measured with Nanodrop 2000 c (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Needham, MA, USA), and an optical density absorption ratio of 260/280 nm between 1.8 and 2.0 confirmed RNA purity.

First-strand cDNA was attained by means of Revert Aid First-Strand cDNA Synthesis kit (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Needham, MA, USA) using oligo (DT) primers. We made diluted 1:10 (*v/v*) working aliquots of the first-strand cDNA and 2 μ L of these aliquots were used in the following steps. qRT-PCR reactions were carried out as follows: 10 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 cycles (designed in one step) at 95 $^{\circ}$ C for 10 s and one cycle at 60 $^{\circ}$ C for 30 s, and a melting curve stage using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) in a 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, US).

Primers used for the study of mRNA expression of SOD1 were: Forward, GGTGTGGCCGAT GTGTCTAT and Reverse, TTCCACCTTTGCCCAAGTCA; and for CAT were: Forward, CTTCGACCCA AGCAACATGC and Reverse, CGGTGAGTGTGCAGGATAGGC. Data were normalized to β -Actin by using the primers: Forward, CCTCGCCTTTGCCGATCC and Reverse, CGCGGCGATAT CATCATCC. Relative quantification analysis was made according the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with Expression Suite software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

2.8. Statistical Analysis

GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was employed to perform the statistical analysis. Parametric variables are expressed as mean \pm standard deviation (SD) and non-parametric variables as median (25th and 75th percentiles). The bar graphs in the figure show mean \pm standard error of the mean (SEM). An unpaired Student's *t*-test was used for comparisons between groups. Correlations between variables were explored using SPSS 17.0 software (SPSS Statistics, Inc. Chicago, IL, USA) and calculated using Spearman's correlation coefficient. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Population

The present study involved 52 type 1 diabetic subjects and 46 healthy controls. Evolution time of the patients' diabetes was 15.8 ± 8.3 years. Table 1 shows non-statistical differences among the groups with respect to sex, age and BMI. Type 1 diabetic patients received continuous antidiabetic treatment consisted of fast-acting insulin (Humalog, Novorapid or Fiasp), and slow-acting insulin (Tresiba, or Toujeo), and as shown in Table 1, antihypertensive medications and lipid-lowering drugs. No subjects were being treated with diuretic agents. The following comorbidities were reported among the type 1 diabetic group: 15 patients were affected by retinopathy, 3 by nephropathy and 3 by neuropathy.

Table 1. Anthropometric characteristics, biochemical determination and pharmacological treatment of the study population.

Characteristics	Control	Type 1 Diabetic Patients	<i>p</i> -Value
<i>n</i>	46	52	
Sex (% men)	46%	50%	
Age (years)	43.4 ± 7.9	41.7 ± 13.0	ns
Duration of diabetes (years)	-	15.8 ± 8.3	
Weight (kg)	73.3 ± 16.0	75.2 ± 17.0	ns
Waist circumference (cm)	84.6 ± 13.1	87.1 ± 13.4	ns
BMI (Kg/m ²)	25.2 ± 4.7	25.3 ± 3.6	ns
SBP (mmHg)	117.8 ± 13.3	120.0 ± 19.6	ns
DBP (mmHg)	70.2 ± 8.4	71.4 ± 8.2	ns
Glucose (mg/dL)	91.9 ± 11.3	167.9 ± 74.8***	<i>p</i> < 0.001
HbA _{1C} -DCCT (%)	5.21 ± 0.22	7.72 ± 1.12***	<i>p</i> < 0.001
Total cholesterol (mg/dL)	189.9 ± 32.7	171.5 ± 29.2	ns
HDL-c (mg/dL)	58.2 ± 12.4	57.8 ± 14.6	ns
LDL-c (mg/dL)	115.1 ± 26.8	98.6 ± 26.4	ns
Triglycerides (mg/dL)	73.0 (54.0–104.0)	73 (53.0–87.0)	ns
hs-CRP (mg/L)	1.15 (0.48–2.0)	1.17(0.56–2.32)	ns
TREATMENT (%)			
Antihypertensive medications	-	9.6%	
Statins	-	40.4%	
Fibrate	-	3.9%	

Data are expressed as mean ± SD for parametric variables and as median (interquartile range) for non-parametric data. An unpaired Student's *t*-test was used for comparisons between groups.*** *p* < 0.001 control vs. type 1 diabetic subjects. Abbreviations: BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HbA_{1C}-DCCT, glycated hemoglobin-according to Diabetes Control and Complications Trial method; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; ns, not significant; SBP, systolic blood pressure.

Anthropometric and metabolic characteristics of the study population are shown in Table 1. We observed significant differences in glucose and HbA_{1C} levels according to diabetes definition (both *p* < 0.001). A reduction in total and LDL-c levels (both *p* < 0.05) was also observed in type 1 diabetic group, probably due to the lipid-lowering treatment received by patients. No other significant differences were found.

3.2. ROS Production and Membrane Potential

When we focused on ROS production in leukocytes, we noticed that both total and mitochondrial ROS levels were higher in type 1 diabetic patients than in control subjects (Figure 1A,B, *p* < 0.05 both), and an increase in mitochondrial membrane potential was observed in the former group (Figure 1C, *p* < 0.05).

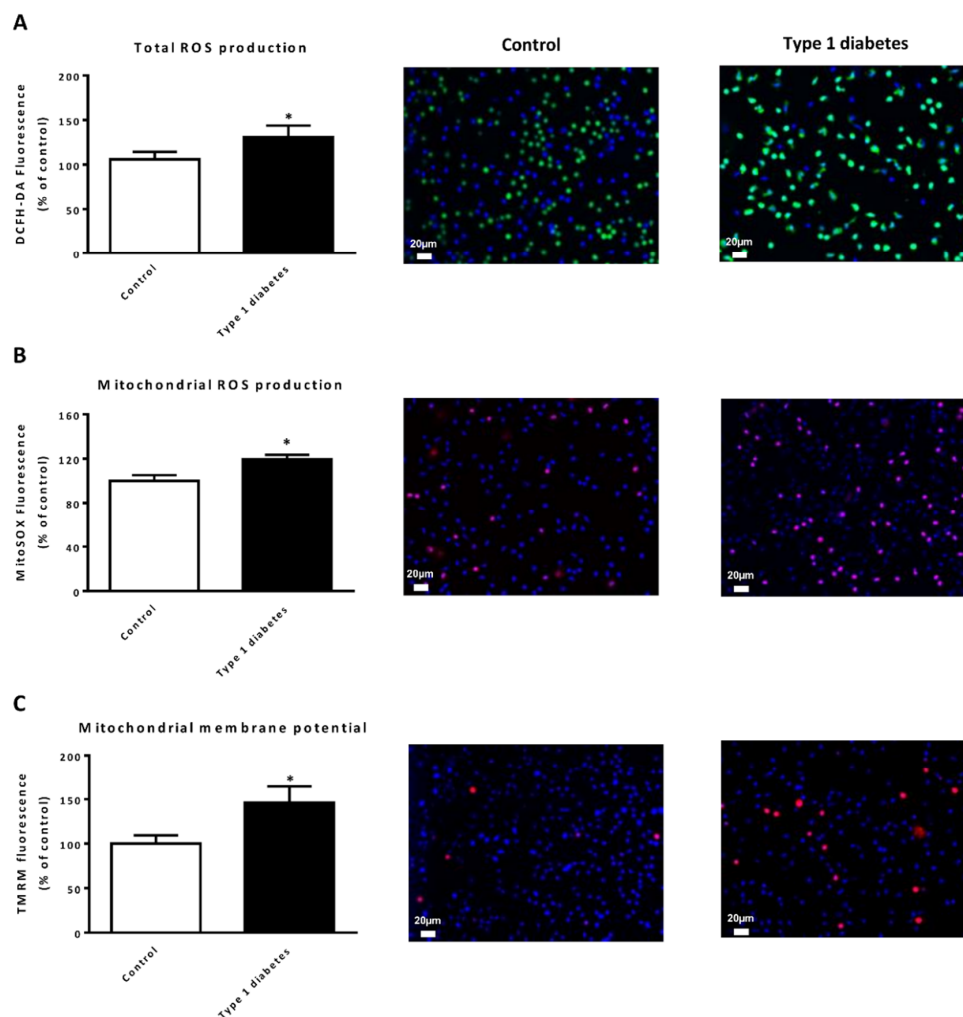


Figure 1. Evaluation of oxidative stress (total and mitochondrial ROS production) and mitochondrial membrane potential in type 1 diabetic and control subjects. **(A)** Levels of total ROS production measured as DCFH-DA fluorescence. Representative images of leukocytes stained with DCFH-DA (green) and Hoechst 33,342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy. **(B)** Levels of mitochondrial ROS production measured as MitoSOX red fluorescence. Representative images of leukocytes stained with MitoSOX (red) and Hoechst 33,342 (blue) by fluorescence microscopy. **(C)** Mitochondrial membrane potential measured as TMRM fluorescence. Representative images of leukocytes stained with TMRM (red) and Hoechst 33,342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy. Fluorescence was measured as arbitrary units of fluorescence and expressed as % of control fluorescence. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ control vs. type 1 diabetic subjects.

3.3. Leukocyte–Endothelium Cell Interaction

The dynamic between isolated PMNs and endothelial cells was explored using a flow-chamber system that measures the flux of PMNs, their velocity and their adhesion to the endothelium. In addition, we chose to evaluate some representative soluble adhesion molecules in serum. The results are shown in Figure 2. PMNs from type 1 diabetic patients showed a decrease in rolling velocity (Figure 2A, $p < 0.001$) and an increase in rolling flux (Figure 2B, $p < 0.01$) compared with those from controls. In addition, we observed an increase in PMNs adhesion (Figure 2C, $p < 0.001$). In line with these results, we detected an increase in the levels of the adhesion molecules P-selectin (Figure 2D, $p < 0.05$), VCAM-1 (Figure 2E, $p < 0.01$) and ICAM-1 (Figure 2F, $p < 0.001$) in type 1 diabetic patients.

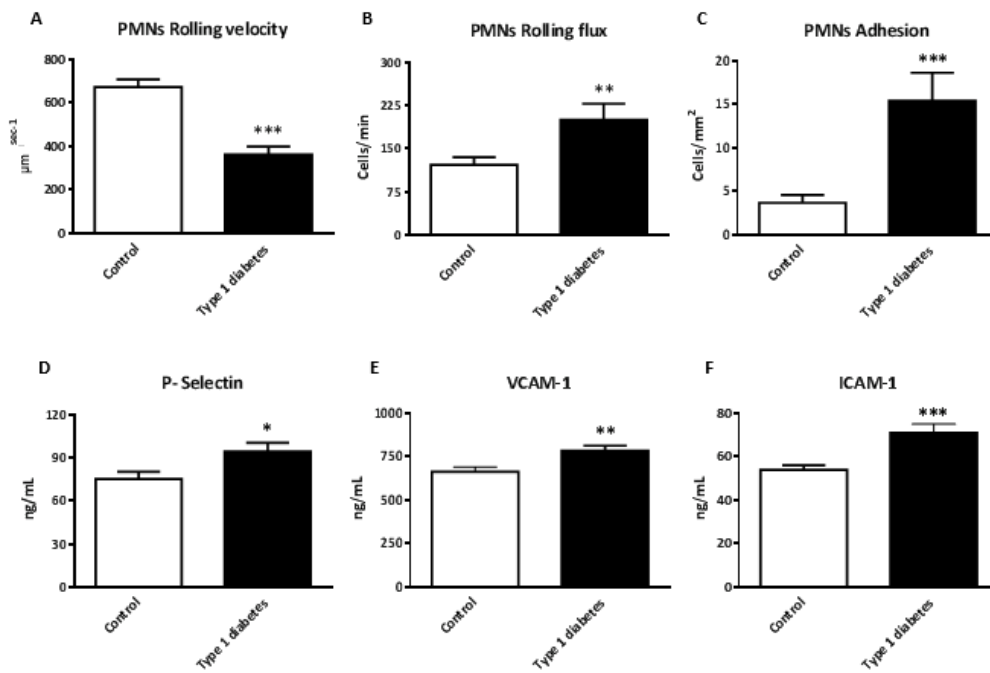


Figure 2. Evaluation of PMNs interactions in type 1 diabetic and control subjects, and levels of adhesion molecules in serum. (A) PMNs rolling velocity ($\mu\text{m}\text{second}^{-1}$); (B) PMN rolling flux (cells/min); (C) PMNs adhesion (cells/mm²); (D) Levels of P-selectin (ng/mL); (E) Levels of VCAM-1 (ng/mL); (F) Levels of ICAM-1 (ng/mL). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ control vs. type 1 diabetic subjects. Abbreviations: ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; PMNs, polymorphonuclear leukocytes; P-selectin: platelet selectin; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1.

3.4. Expression of Inflammatory Mediators

As expected, when serum TNF α levels were analyzed the data revealed an increase in type 1 diabetic patients with respect to controls (Figure 3A, $p < 0.01$), but differences in IL-6 serum levels were not found between the two groups (Figure 3B). Lastly, when we explored MPO levels, we observed an increase in serum levels in type 1 diabetic patients versus controls (Figure 3C, $p < 0.01$).

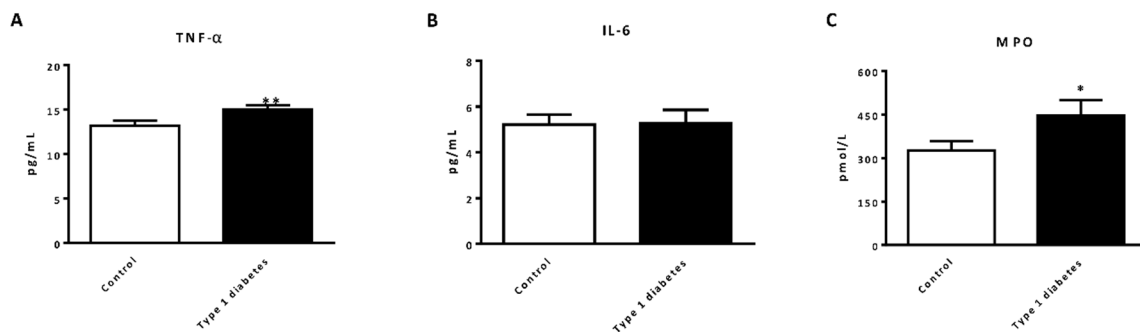


Figure 3. Evaluation of serum levels of cytokines and mediators of inflammation in type 1 diabetic and control subjects. (A) Serum levels of TNF α (pg/mL); (B) Serum levels of IL-6 (pg/mL); (C) Serum levels of MPO (pmol/L). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ control vs. type 1 diabetic subjects. Abbreviations: IL-6, interleukin 6; MPO, myeloperoxidase; TNF α : tumor necrosis factor alpha.

3.5. Antioxidant Gene Expression

We have measured the antioxidant gene expression of SOD and CAT. Figure 4A shows that there was a decrease in type 1 diabetic patients with respect to controls (Figure 4A, $p < 0.05$), but differences in CAT levels were not found between the two groups (Figure 4B).

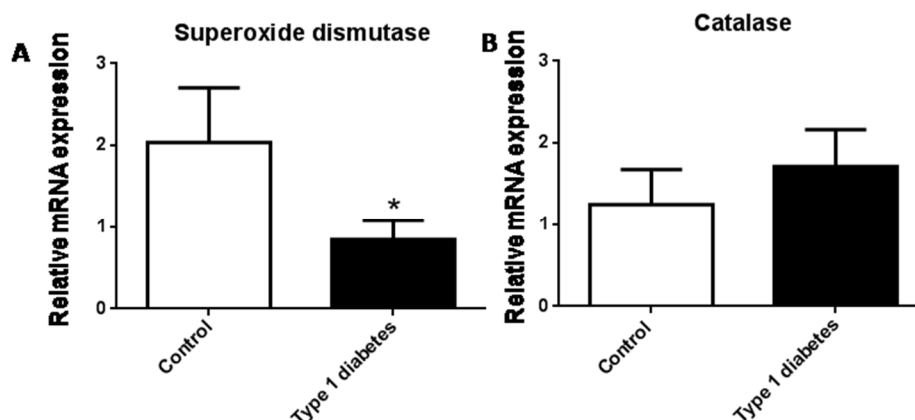


Figure 4. Evaluation of mRNA expression of SOD (A) and CAT (B) in type 1 diabetic and control subjects. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, control vs. type 1 diabetic subjects. * $p < 0.05$ control vs. type 1 diabetic subjects.

3.6. Correlations Studies

We further explored possible correlations with glucose and HbA_{1C} levels in the study population (Table 2). Glucose was negatively correlated with rolling velocity ($r = -0.457$; $p < 0.05$) and positively correlated with cellular adhesion ($r = 0.369$; $p < 0.001$), to ICAM-1 ($r = 0.335$; $p < 0.05$) and VCAM-1 ($r = 0.291$; $p < 0.05$). In addition, HbA_{1C} was negatively correlated with rolling velocity ($r = -0.719$; $p < 0.001$), and positively correlated with rolling flux ($r = 0.401$; $p < 0.05$), cellular adhesion ($r = 0.658$; $p < 0.001$), ICAM-1 ($r = -0.497$; $p < 0.001$), VCAM-1 ($r = 0.397$; $p < 0.01$) and TNF α ($r = 0.397$; $p < 0.05$). TNF α was positively correlated with mitochondrial membrane potential ($r = -0.406$; $p < 0.05$), rolling flux ($r = 0.469$; $p < 0.05$) and MPO ($r = 0.402$; $p < 0.05$). Total ROS production was negatively correlated with rolling velocity ($r = -0.395$; $p < 0.05$), and VCAM-1 was correlated with IL-6 ($r = 0.491$; $p < 0.01$), while MPO correlated with hs-CRP ($r = 0.427$; $p < 0.05$). It is important to take into account that $r < 0.5$ has been considered to be a weak correlation.

Table 2. Correlations between glucose blood, ROS production, leukocyte–endothelium interaction and inflammation in study population.

Parameters	Glucose		HbA _{1C} -DCCT		Total ROS Production		TNF α		hs-CRP	
Rolling velocity	r = -0.457	p < 0.05	r = -0.719	p < 0.001	r = -0.395	p < 0.05	-	-	-	-
Rolling flux	-	-	r = 0.401	p < 0.05	-	-	r = 0.469	p < 0.05	-	-
Cellular adhesion	r = 0.369;	p < 0.001	r = 0.658	-	-	-	-	-	-	-
ICAM-1	r = 0.335	p < 0.05	r = 0.497	-	-	-	-	-	-	-
VCAM-1	r = 0.291	p < 0.05	r = 0.397	-	-	-	-	-	-	-
TNFα	-	-	r = 0.397	p < 0.05	-	-	-	-	-	-
IL-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPO	-	-	-	-	-	-	r = 0.402	p < 0.05	r = 0.427	p < 0.05
Membrane potential	-	-	-	-	-	-	r = 0.406	p < 0.05	-	-

Correlation coefficients were estimated by Pearson’s correlation for parametric parameters or Spearman’s correlation when data were not normally distributed. Abbreviations: HbA_{1C}-DCCT, glycated hemoglobin HbA_{1C}-according to Diabetes Control and Complications Trial method; hs-CRP, highly sensitive C-reactive protein; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL-6, interleukin-6; MPO, myeloperoxidase; ROS, reactive oxygen species TNF- α , Tumor necrosis factor alpha; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

4. Discussion

The results of the present study show an increase in fasting levels of HbA_{1C} and glucose in type 1 diabetic patients with respect to controls, as expected. Several animal and human studies have provided evidence that hyperglycemia can cause pathological changes in endothelial cells through different pathways, such as activation of protein kinase C, AGEs and polyol and hexosamine pathways [13,25–27]. In addition to these alterations, the present study highlights mitochondrial alterations (defined as an increase in total and mitochondrial ROS production and mitochondrial membrane potential) in PMNs from type 1 diabetic patients. Mitochondria are one of the most important sources of ROS production, and play a key role in diabetes [28,29]. Physiologically, ROS are released by inflammatory cells and the endothelium, and an exacerbated ROS production can damage cells and lead to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in β -cells, which are related to type 1 diabetes [18,27]. For these reasons, restoring mitochondrial ROS homeostasis could be essential for preventing diabetic complications and improving endothelial function in CVDs, as demonstrated by several meta-analysis studies on antioxidant supplementation in diabetic patients [30–32]. Furthermore, we should remember that type 1 diabetes is an autoimmune disease; it has been shown that mitochondrial function is essential for T cell activation and function and antigen presentation (as naive and memory cells depend on efficient mitochondrial oxidative phosphorylation) [33–35].

We have observed an increase in mitochondrial membrane potential in leukocytes from type 1 diabetic patients. In line with this, Jing et al., described an inner-membrane hyperpolarization of mitochondria in human T cells from type 1 diabetics subjects that did not correlate with metabolic control, subject age or duration of diabetes, but was correlated with ROS levels and subsequent IFN γ production [35]. In accordance with our results, it has been described that β cells exposed to hyperglycemia are prone to high levels of reducing equivalents and consumption of adenosine diphosphate (ADP) [36], resulting in an enhanced mitochondrial membrane potential and, therefore, enhanced ROS production.

The role of mitochondrial dysfunction in leukocytes has been related to vascular complications such as silent myocardial ischemia [37], but this has not been explored in depth in type 1 diabetes. To take a step further and investigate these dynamics in type 1 diabetes, we have developed an ex vivo model in which human leukocytes flow over a monolayer of human endothelial cells with shear stress [37]. This methodology mimics the process that occurs during the atherosclerosis in vivo (rolling and adhesion), which is critical for vascular integrity and homeostasis. In the present study, we have observed that type 1 diabetic patients display increased leukocyte–endothelium interactions; specifically, we have observed decreased PMN rolling velocity and increased rolling flux and adhesion, which are results of great relevance. It is important to highlight that our system has been widely used for analyzing the recruitment of leukocytes to the endothelium [38], and that this process has been poorly studied in type 1 diabetes until now. To visualize the whole adhesion cascade, we explored some of the adhesion molecules and inflammatory mediators involved in this process. We observed an increase of the adhesion molecules P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 expression, together with proinflammatory markers TNF α and MPO. Hypertension, CVDs and the atherosclerotic process are characterized by leukocyte recruitment to the vascular wall. In fact, when leukocyte–endothelium interactions are exacerbated, vascular dysfunction arises, leading to CVDs [39]. In addition, we have demonstrated a decrease of SOD expression, highlighting the oxidative stress situation under type 1 diabetes condition.

Lastly, we demonstrate that levels of glucose are negatively correlated with rolling velocity and positively correlated with cellular adhesion, ICAM-1 and VCAM-1, thus supporting a role for glycemic control in inflammation and the atherosclerotic process [18], as illustrated previously in animal models [40]. In support of this hypothesis, HbA_{1C} levels were also negatively correlated with rolling velocity and positively correlated with rolling flux, cellular adhesion, ICAM-1, VCAM-1 and TNF α . In this way, we can affirm that hyperglycemia enhances levels of HbA_{1C} and promotes mitochondrial impairment, leading to enhanced leukocyte–endothelium interactions [36]. In this sense,

increased leukocyte–endothelium interaction has been associated with insulin resistance [24,29]. In line with the present study, a decreased venular shear rate and an enhanced number of rolling leukocytes in mesenteric vessels have previously been reported in diabetic patients with respect to controls in study employing an animal model [41].

Adhesion molecules such as P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 are key factors resulting from endothelial activation. In the present study, we have shown that type 1 diabetic patients exhibit an increase in these adhesion molecules. Furthermore, our data for leukocyte–endothelium interactions demonstrate an enhanced production of vascular adhesion molecules, thus providing strong evidence of the inflammatory process that occurs in type 1 diabetes and which can eventually lead to CVDs [18]. In addition, we report an increase of TNF α , a trend related to an impairment in insulin signaling [42]. Furthermore, different studies have shown that increased levels of MPO, IL-6 and hs-CRP are significantly associated with an increased risk of diabetes [22,43]. Our data show a rise in MPO levels and a correlation with hs-CRP levels, prompting the hypothesis that this enzyme is also important in the development of microvascular alterations in type 1 diabetes [44].

5. Conclusions

In conclusion, the current study provides evidence of oxidative stress, mitochondrial alterations, antioxidant decrease and especially enhanced leukocyte–endothelium interactions in leukocytes of type 1 diabetic patients. It is important to highlight the role of increased leukocyte–endothelium interactions and their possible role in the development of atherosclerosis in type 1 diabetes. However, knowledge of the role of mitochondrial alterations, ROS and leukocyte–endothelium interactions in type 1 diabetes is still insufficient. Future studies should focus on these features to clarify the nature of the molecular mechanisms involved in type 1 diabetes and to modulate them in both type 1 diabetes and related CVDs.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.V. and M.R.; Data curation, F.I., A.M.d.M., Z.A.-J., F.C., P.D.-P. and S.L.-D.; Formal analysis, F.I., A.M.d.M., Z.A.-J., F.C., P.D.-P., S.L.-D. and C.M.; Funding acquisition, V.M.V. and M.R.; Investigation, F.I., A.M.d.M., F.C., V.M.V. and M.R.; Methodology, V.M.V.; Project administration, V.M.V. and M.R.; Resources, V.M.V. and M.R.; Supervision, V.M.V., and M.R.; Validation, V.M.V., M.R. and C.M.; Visualization, F.I., A.M.d.M. and Z.A.-J.; Writing—Original draft, F.I., V.M.V. and M.R.; Writing—Review & editing, F.I., A.M.d.M., Z.A.-J., F.C., P.D.-P., S.L.-D., C.M., M.R. and V.M.V. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This study was financed by grants PI19/0838, PI19/00437, CIBERehd CB06/04/0071 from Carlos III Health Institute (ISCIII) and by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”), by PROMETEO/2019/027 by Ministry of Education of the Valencian Regional Government, and by an unrestricted grant from Menarini S.A. F.I and F.C. are recipients of contracts from the Ministry of Education of the Valencian Regional Government (GRISOLIAP/2016/015 and GRISOLIAP/2019/091 respectively). Z.A.-J. and A.D.M. are recipients of predoctoral fellowships from Carlos III Health Institute (FI17/00144 and FI17/00126 respectively). MR is the recipient of a Miguel Servet (CPII16/0037) contract from Carlos III Health Institute. V.M.V. is the recipient of contracts from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government and Carlos III Health Institute (CES10/030).

Acknowledgments: We thank Brian Normanly for his editorial assistance (CIBERehd/University of Valencia).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Boudina, S.; Sena, S.; O'Neill, B.T.; Tathireddy, P.; Young, M.E.; Abel, E.D. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* **2005**, *112*, 2686–2695. [[CrossRef](#)]
2. Shen, X.; Zheng, S.; Metreveli, N.S.; Epstein, P.N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **2006**, *55*, 798–805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bashan, N.; Kovsan, J.; Kachko, I.; Ovadia, H.; Rudich, A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 27–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Drews, G.; Krippeit-Drews, P.; Dufer, M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflug. Arch.* **2010**, *460*, 703–718. [[CrossRef](#)]
5. Vollaard, N.B.; Shearman, J.P.; Cooper, C.E. Exercise-Induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.* **2005**, *35*, 1045–1062. [[CrossRef](#)]
6. Roper, N.A.; Bilous, R.W.; Kelly, W.F.; Unwin, N.C.; Connolly, V.M. South tees diabetes mortality study cause-specific mortality in a population with diabetes: South tees diabetes mortality study. *Diabetes Care* **2002**, *25*, 43–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. De Ferranti, S.D.; De Boer, I.H.; Fonseca, V.; Fox, C.S.; Golden, S.H.; Lavie, C.J.; Magge, S.N.; Marx, N.; McGuire, D.K.; Orchard, T.J.; et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation* **2014**, *130*, 1110–1130. [[CrossRef](#)]
8. Dawson, S.I.; Willis, J.; Florkowski, C.M.; Scott, R.S. Cause-specific mortality in insulin-treated diabetic patients: A 20-year follow-up. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2008**, *80*, 16–23. [[CrossRef](#)]
9. Secrest, A.M.; Becker, D.J.; Kelsey, S.F.; Laporte, R.E.; Orchard, T.J. Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes* **2010**, *59*, 3216–3222. [[CrossRef](#)]
10. Singh, R.B.; Mengi, S.A.; Xu, Y.J.; Arneja, A.S.; Dhalla, N.S. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp. Clin. Cardiol.* **2002**, *7*, 40–53.
11. Valsania, P.; Zarich, S.W.; Kowalchuk, G.J.; Kosinski, E.; Warram, J.H.; Krolewski, A.S. Severity of coronary artery disease in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. Heart J.* **1991**, *122*, 695–700. [[CrossRef](#)]
12. Nishimura, R.; Tanaka, Y.; Koiwai, K.; Inoue, K.; Hach, T.; Salsali, A.; Lund, S.S.; Broedl, U.C. Effect of empagliflozin monotherapy on postprandial glucose and 24-h glucose variability in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled, 4-week study. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gleissner, C.A.; Galkina, E.; Nadler, J.L.; Ley, K. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* **2007**, *4*, 131–140. [[CrossRef](#)]
14. Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Apostolova, N.; Borrás, C.; Jover, A.; Banuls, C.; Sola, E.; Victor, V.M. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1215–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Giugliano, D.; Ceriello, A.; Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **1996**, *19*, 257–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bevilacqua, M.P.; Nelson, R.M. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb. Haemost* **1993**, *70*, 152–154. [[CrossRef](#)]
17. Rhee, S.Y.; Kim, Y.S. The role of advanced glycation end products in diabetic vascular complications. *Diabetes Metab. J.* **2018**, *42*, 188–195. [[CrossRef](#)]
18. Jay, D.; Hitomi, H.; Griendling, K.K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 183–192. [[CrossRef](#)]
19. Jude, E.B.; Eleftheriadou, I.; Tentolouris, N. Peripheral arterial disease in diabetes—A review. *Diabet. Med.* **2010**, *27*, 4–14. [[CrossRef](#)]
20. Gogitidze Joy, N.; Hedrington, M.S.; Briscoe, V.J.; Tate, D.B.; Ertl, A.C.; Davis, S.N. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care* **2010**, *33*, 1529–1535. [[CrossRef](#)]
21. Wright, R.J.; Visness, C.M.; Calatroni, A.; Grayson, M.H.; Gold, D.R.; Sandel, M.T.; Lee-Parritz, A.; Wood, R.A.; Kattan, M.; Bloomberg, G.R.; et al. Prenatal maternal stress and cord blood innate and adaptive cytokine responses in an inner-city cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**, *182*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rovira-Llopis, S.; Rocha, M.; Falcon, R.; De Pablo, C.; Alvarez, A.; Jover, A.; Hernandez-Mijares, A.; Victor, V.M. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1452–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. American Diabetes Association Standards of medical care in diabetes—2013. *Diabetes Care* **2013**, *36*, S11–S66. [[CrossRef](#)]

24. Escribano-Lopez, I.; Diaz-Morales, N.; Iannantuoni, F.; Lopez-Domenech, S.; De Maranon, A.M.; Abad-Jimenez, Z.; Banuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Herance, J.R.; Rocha, M.; et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15862. [[CrossRef](#)]
25. Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.A.; Beebe, D.; Oates, P.J.; Hammes, H.P.; et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **2000**, *404*, 787–790. [[CrossRef](#)]
26. Cappellari, R.; D'Anna, M.; Menegazzo, L.; Bonora, B.M.; Albiero, M.; Avogaro, A.; Fadini, G.P. Diabetes mellitus impairs circulating proangiogenic granulocytes. *Diabetologia* **2020**. [[CrossRef](#)]
27. Chen, J.; Stimpson, S.E.; Fernandez-Bueno, G.A.; Mathews, C.E. Mitochondrial reactive oxygen species and Type 1 diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1361–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Burgos-Moron, E.; Abad-Jimenez, Z.; Maranon, A.M.; Iannantuoni, F.; Escribano-Lopez, I.; Lopez-Domenech, S.; Salom, C.; Jover, A.; Mora, V.; Roldan, I.; et al. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in Type 2 Diabetes: The battle continues. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Iannantuoni, F.; Diaz-Morales, N.; Escribano-Lopez, I.; Sola, E.; Roldan-Torres, I.; Apostolova, N.; Banuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Rocha, M.; Victor, V.M. Does Glycemic Control Modulate the Impairment of NLRP3 Inflammasome Activation in Type 2 Diabetes? *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *30*, 232–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mansournia, M.A.; Ostadmohammadi, V.; Doosti-Irani, A.; Ghayour-Mobarhan, M.; Ferns, G.; Akbari, H.; Ghaderi, A.; Talari, H.R.; Asemi, Z. The effects of vitamin D supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Horm. Metab. Res.* **2018**, *50*, 429–440. [[CrossRef](#)]
31. Balbi, M.E.; Tonin, F.S.; Mendes, A.M.; Borba, H.H.; Wiens, A.; Fernandez-Llimos, F.; Pontarolo, R. Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
32. Heitzer, T.; Finckh, B.; Albers, S.; Krohn, K.; Kohlschutter, A.; Meinertz, T. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: Relation to parameters of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 53–61. [[CrossRef](#)]
33. Quintana, A.; Schwindling, C.; Wenning, A.S.; Becherer, U.; Rettig, J.; Schwarz, E.C.; Hoth, M. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14418–14423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nagy, G.; Barcza, M.; Gonchoroff, N.; Phillips, P.E.; Perl, A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 3676–3683. [[CrossRef](#)]
35. Chen, J.; Chernatynskaya, A.V.; Li, J.W.; Kimbrell, M.R.; Cassidy, R.J.; Perry, D.J.; Muir, A.B.; Atkinson, M.A.; Brusko, T.M.; Mathews, C.E. T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10835. [[CrossRef](#)]
36. Wiederkehr, A.; Wollheim, C.B. Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* **2008**, *44*, 64–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Rovira-Llopis, S.; Banuls, C.; Bellod, L.; De Pablo, C.; Alvarez, A.; Roldan-Torres, I.; Sola-Izquierdo, E.; Victor, V.M. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1695–1702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rao, R.M.; Yang, L.; Garcia-Cardena, G.; Lusinskas, F.W. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ. Res.* **2007**, *101*, 234–247. [[CrossRef](#)]
39. Krieglstein, C.F.; Granger, D.N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am. J. Hypertens.* **2001**, *14*, 44S–54S. [[CrossRef](#)]
40. Steven, S.; Oelze, M.; Hanf, A.; Kroller-Schon, S.; Kashani, F.; Roohani, S.; Welschhof, P.; Kopp, M.; Godtel-Armbrust, U.; Xia, N.; et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 370–385. [[CrossRef](#)]
41. Panes, J.; Granger, D.N. Neutrophils generate oxygen free radicals in rat mesenteric microcirculation after abdominal irradiation. *Gastroenterology* **1996**, *111*, 981–989. [[CrossRef](#)]

42. Gonzalez, F.; Minium, J.; Rote, N.S.; Kirwan, J.P. Altered tumor necrosis factor alpha release from mononuclear cells of obese reproductive-age women during hyperglycemia. *Metabolism* **2006**, *55*, 271–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, X.; Bao, W.; Liu, J.; Ouyang, Y.Y.; Wang, D.; Rong, S.; Xiao, X.; Shan, Z.L.; Zhang, Y.; Yao, P.; et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 166–175. [[CrossRef](#)]
44. Parrinello, C.M.; Lutsey, P.L.; Ballantyne, C.M.; Folsom, A.R.; Pankow, J.S.; Selvin, E. Six-year change in high-sensitivity C-reactive protein and risk of diabetes, cardiovascular disease, and mortality. *Am. Heart J.* **2015**, *170*, 380–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO II

**OTRAS PUBLICACIONES CON AUTORÍA DURANTE EL DESARROLLO
DE LA TESIS DOCTORAL**

1. **Iannantuoni, F**, Salazar, JD, Martinez de Marañon, A, Bañuls, C, López-Domènech, S, Rocha, M, Hurtado-Murillo, F, Morillas, C, Gómez-Balaguer, M, Víctor, VM. (2020) Testosterone administration increases leukocyte-endothelium interactions and inflammation in transgender men. *Fertil Steril.* Oct 5:S0015-0282(20)30722-6 (Online ahead of print.)

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,312

Categoría: REPRODUCTIVE BIOLOGY (D1)

2. Abad-Jiménez, Z, López-Domènech, S, Díaz-Rúa, R, **Iannantuoni, F**, Gómez-Abril, SÁ, Periañez-Gómez, D, Morillas, C, Víctor, VM, Rocha, M. (2020) Systemic oxidative stress and visceral adipose tissue mediators of NLRP3 inflammasome and autophagy are reduced in obese type 2 diabetic patients treated with metformin. *Antioxidants.* 9:892.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,014

Categoría: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (Q1)

3. de Marañon, AM, Iannantuoni, F, Abad-Jiménez, Z, Canet, F, Díaz-Pozo, P, López-Domènech, S, Roldán-Torres, I, Morillas, C, Rocha, M, Víctor, VM. (2020) Association between proinflammatory markers, leukocyte-endothelium interactions, and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: role of glycemic control. *J Clin Med.* 9:2522.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,688

Categoría: MEDICINE GENERAL & INTERNAL (Q1)

4. Apostolova, N, **Iannantuoni, F**, Gruevska, A, Muntane, J, Rocha, M, Víctor, VM. (2020) Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox Biol.* 34:101517

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 9,986

Categoría: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (D1)

5. De Marañon, AM, **Iannantuoni, F**, Abad-Jiménez, Z, Canet, F, Díaz-Pozo, P, López-Domènech, S, Jover, A, Morillas, C, Mariño, G, Apostolova, N, Rocha, M, Víctor, VM. (2020) Relationship between PMN-endothelium interactions, ROS production and beclin-1 in type 2 diabetes. *Redox Biol.* 34:101563.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 9,986

Categoría: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (D1)

6. Humeau, J, Sauvat, A, Cerrato, G, Xie, W, Loos, F, **Iannantuoni, F**, Bezu, L, Lévesque, S, Paillet, J, Pol, J, Leduc, M, Zitvogel, L, de Thé, H, Kepp, O, Kroemer, G. Inhibition of transcription by dactinomycin reveals a new characteristic of immunogenic cell stress. (2020) *EMBO Mol Med.* 12:e11622.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 8,821

Categoría: MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL (D1)

7. Burgos-Morón, E, Abad-Jiménez, Z, Marañón, AM, **Iannantuoni, F**, Escribano-López, I, López-Domènech, S, Salom, C, Jover, A, Mora, V, Roldan, I, Solá, E, Rocha, M, Víctor, VM. (2019) Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: The battle continues. *J Clin Med.* 8:1385.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,688

Categoría: MEDICINE GENERAL & INTERNAL (Q1)

8. Escribano-López, I, de Marañon, AM, **Iannantuoni, F**, López-Domènech, S, Abad-Jiménez, Z, Díaz, P, Solá, E, Apostolova, N, Rocha, M, Víctor, VM. (2019) The mitochondrial antioxidant ss-31 modulates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in type 2 diabetes. *J Clin Med.* 8:1322.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,688

Categoría: MEDICINE GENERAL & INTERNAL (Q1)

9. Escribano-Lopez, I, Bañuls, C, Diaz-Morales, N, **Iannantuoni, F**, Rovira-Llopis, S, Gomis, R, Rocha, M, Hernandez-Mijares, A, Murphy, MP, Víctor, VM. (2019) The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates mitochondrial function and endoplasmic reticulum stress in pancreatic β cells exposed to hyperglycaemia. *Cell Physiol Biochem.* 52:186-197.

Tipo de publicación: Artículo científico
Factor de impacto: 5,500
Categoría: PHYSIOLOGY (D1)

10. López-Domènech, S, Abad-Jiménez, Z, **Iannantuoni, F**, de Marañón, AM, Rovira-Llopis, S, Morillas, C, Bañuls, C, Víctor, VM, Rocha, M. (2019) Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity. *Mol Metab.*19:24-33.

Tipo de publicación: Artículo científico
Factor de impacto: 6,448
Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (D1)

11. Escribano-Lopez, I, Diaz-Morales, N, **Iannantuoni, F**, Lopez-Domenech, S, de Marañón, AM, Abad-Jimenez, Z, Bañuls, C, Rovira-Llopis, S, Herance, JR, Rocha, M, Victor, VM. (2018) The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes. *Sci Rep.* 8:15862.

Tipo de publicación: Artículo científico
Factor de impacto: 3,998
Categoría: MULTIDISCIPLINARY SCIENCE (Q1)

12. Rovira-Llopis, S, Escribano-Lopez, I, Diaz-Morales, N, **Iannantuoni, F**, Lopez-Domenech, S, Andújar, I, Jover, A, Pantoja, J, Pallardo, LM, Bañuls, C, Victor, VM. (2018) Downregulation of miR-31 in diabetic nephropathy and its relationship with inflammation. *Cell Physiol Biochem.* 50:1005-1014

Tipo de publicación: Artículo científico
Factor de impacto: 5,500
Categoría: PHYSIOLOGY (D1)

13. Diaz-Morales, N, Lopez-Domenech, S, **Iannantuoni, F**, Lopez-Gallardo, E, Sola, E, Morillas, C, Rocha, M, Ruiz-Pesini, E, Victor, VM. (2018) Mitochondrial DNA haplogroup JT is related to impaired glycaemic control and renal function in type 2 diabetic patients. *J Clin Med.*7:220.

Tipo de publicación: Artículo científico
Factor de impacto: 5,688
Categoría: MEDICINE GENERAL & INTERNAL (Q1)

14. Diaz-Morales, N, **Iannantuoni, F**, Escribano-Lopez, I, Bañuls, C, Rovira-Llopis, S, Sola, E, Rocha, M, Hernandez-Mijares, A, Victor, VM. (2018) Antioxid Redox Signal. 28:1562-1569. Does metformin modulate

endoplasmic reticulum stress and autophagy in type 2 diabetic peripheral blood mononuclear cells?

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 7,040

Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (D1)