



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Facultad de Ciències Biològiques  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Tesis doctoral

Estudio de los mecanismos moleculares de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés de retículo endoplasmático y autofagia en leucocitos de pacientes con diabetes tipo 2

Presentada por  
Susana Rovira Llopis  
Valencia, 2015



Víctor Manuel Víctor González, Investigador Miguel Servet en la Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana, y profesor asociado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, Milagros Rocha Barajas, Investigadora Miguel Servet en la Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana, y Antonio Hernández Mijares, Jefe del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset y Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, certifican que la memoria titulada “Estudio de los mecanismos moleculares de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés de retículo endoplasmático y autofagia en leucocitos de pacientes con diabetes tipo 2” ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset por Susana Rovira Llopis para optar al grado de doctor en Biología por la Universitat de València.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Valencia, a 19 de octubre de 2015

Víctor Manuel Víctor González

Milagros Rocha Barajas

Antonio Hernández Mijares



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la financiación de los proyectos: “Disfunción mitocondrial y diabetes tipo 2: Implicaciones patofisiológicas y clínicas” con referencia PI10/01195; y “Disfunción endotelial-mitocondrial, estrés de retículo y autofagia en la diabetes tipo 2: Implicaciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas” con referencia PI13/1025; del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), de la convocatoria de Ayudas de la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III.

Susana Rovira Llopis ha disfrutado de una Ayuda Predoctoral del Fondo de Investigación Sanitaria (PFIS) del Instituto de Salud Carlos III.



*“Lo que convierte a la vida en una bendición  
no es hacer lo que nos gusta,  
sino que nos guste lo que hacemos.”*

***Goethe***





*A les quatre fieretes*

*A Sergio*



# AGRADECIMIENTOS



En primer lugar me gustaría darles las gracias a mis directores Víctor, Milagros y Antonio por haberme dado la gran oportunidad de realizar esta tesis. A Víctor por su apoyo constante, su perseverancia y su actitud positiva y tenaz, gracias a la cual he aprendido a luchar por lo que uno quiere y hacer frente a las dificultades, cuesten lo que cuesten. A Milagros por su generosidad, por aportar siempre un enfoque lógico y comprensible a lo que parece inexplicable, y por esa meticulosidad que la caracteriza y hace que los resultados de nuestro trabajo rocen la perfección. A Antonio por haber creído en mí y haberme apoyado desde el primer momento, mostrándome que con dedicación y constancia se puede alcanzar todo lo que uno se propone. En definitiva, gracias a la confianza de estos tres profesionales, he crecido como investigadora, pero también como persona, consiguiendo alcanzar una gran meta en mi carrera científica, pero sobre todo aprendiendo y siguiendo su ejemplo de empeño y dedicación. También agradezco a la Dra. Costanza Emanuelli el haberme acogido en su laboratorio en la Universidad de Bristol, permitiéndome disfrutar de una experiencia inolvidable.

Quisiera dar las gracias a mis compañeras, esta tesis no habría sido la misma sin vosotras. Celia, esa paciencia que te caracteriza, Rosa, tan dulce y generosa, Raquel, esa energía, Noelia, toda nobleza, Sandra, tan natural y espontánea, e Irene, ternura en persona. Qué bien se trabaja con ese buen rollito, bromas, risas y buen humor. Gracias por vuestro apoyo, sois únicas. Al Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Dr. Peset, médicos, enfermeras y secretarias, atentos, amables y sobre todo profesionales. Durante esta experiencia también he compartido buenos momentos, aunque durante menos tiempo, con los compañeros del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Ana, Dolo, Nade, Carmen, Samu, Miriam, Haryes, Nando, Alberto, César, Jesús, Amelia y Carlos, un equipo de investigación de primera. Y con Raul, el catalán más dicharachero que he conocido. También quiero recordar a los compañeros de Bristol, la Little Italy, con los que compartí tres meses mágicos e irrepetibles, en especial a mis lovelys Francesca y Ambra, y cómo no, a mis papis en el exilio, Graciela y Andrew, siempre os estaré agradecida.

A nivel personal, gracias Sergio, porque los dos somos uno, por la seguridad que da el tenerte a mi lado en cada paso que doy y porque sin las ilusiones que compartimos nada tendría sentido, ni siquiera el estrés reticular que tanto te ha preocupado. Agradezco a mi familia la confianza y el apoyo que me han prestado en todo momento, aun sin comprender muy bien qué me traía entre manos.

A mi madre, porque siempre me acompaña, a mi padre, por inculcarme el valor del esfuerzo, a mis hermanos M<sup>a</sup> Paz y Edu, por estar siempre a mi lado y cuidarme como la pequeña que soy. A mis cuatro chiquitines, Sergio, Marc, Alejandro y Enric, porque sois la alegría de mi vida. A mi cuñada Mayte, por su entusiasmo, a Fina, por su dulzura. Y cómo no, a mi familia política, abuelitos y tíos de Sergio, con los que me siento en casa, M<sup>a</sup>Amparo y Vicente, gracias por vuestra generosidad y cariño, y a mi cuñado favorito Víctor, por esa espontaneidad.

A les meues perles, Isa, Laura, Montse, Saray, Eva, Cris, Marian, Tamara, Evi, Sandra, Ana, Angela y Mouctar, porque con vosotras todo son risas, sois las mejores y lo sabéis. Isa, gracias por tu confianza y fidelidad. Montse, aunque lejos, tú siempre estás aquí, Laura, siempre positiva, y Saray, recordaré la peli de 300.

Gracias también a mis amigos de la universidad, esa “Secta de biólogos”, por los buenos momentos que hemos vivido, Silvia, Ana, Jose, Pepe, Lauri, Nico, Miguel, Rebeca, Anabel y Juanan, sois simplemente geniales. Y no quisiera olvidarme de la gente que me acompañó en mis inicios, cuando todavía no tenía muy claro qué era esto de la investigación. Lo que era el grupo de Genética y Medicina Molecular del Instituto de Biomedicina de Valencia, con los que pasé dos años formidables y de los que me llevé buenísimos recuerdos, tanto a nivel profesional como personal, en especial a mis nenas, Arantxa y Franzí.

Gracias a todos por haberme acompañado en esta etapa tan bonita.

## ABREVIATURAS

<b><math>\Delta\psi</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGEs</b>	Productos avanzados de glicosilación
<b>Apo A1</b>	Apolipoproteína A1
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATF4</b>	Factor activador de la transcripción 4
<b>ATF6</b>	Factor activador de la transcripción 6
<b>Atg</b>	Gen relacionado con la autofagia
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAM</b>	Molécula de adhesión celular
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CHOP</b>	Proteína homóloga de C/EBP de unión al enhancer CCAAT
<b>CIS</b>	Cardiopatía isquémica silente
<b>CTE</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DPP-4</b>	Dipeptidil peptidasa 4
<b>ECV</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Iniciador de la traducción eucariótica, subunidad alfa
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa endotelial
<b>ERAD</b>	Respuesta de degradación asociada al retículo endoplasmático
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GRP78</b>	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HOMA-IR</b>	Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Inhibidor de la quinasa kappa beta
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 beta
<b>IL6</b>	Interleuquina 6



<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRE1</b>	Enzima que requiere inositol 1
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>JNK</b>	Quinasa c-jun n-terminal
<b>LC3</b>	Cadena ligera 3 asociada al microtúbulo
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>MnSOD</b>	Manganeso superóxido dismutasa
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en mamíferos
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NLRP3</b>	Proteína de la familia del receptor NOD, dominio pirina 3
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>Nrf2</b>	Factor de transcripción nuclear E2
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>••</sup></b>	Superóxido
<b>O-GlcNAc</b>	O-β-N-acetilglucosamina
<b>•OH</b>	Hidroxilo
<b>ONOO-</b>	Peroxinitrito
<b>p66shc</b>	Proteína adaptadora de 66-kDa, homóloga de colágeno Src
<b>PCR</b>	Proteína C-reactiva
<b>PECAM</b>	Molécula de adhesión plaqueto-endotelial
<b>PERK</b>	Quinasa de retículo endoplasmático PKR-like
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>RAGE</b>	Receptor de productos avanzados de glicosilación
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RI</b>	Resistencia a insulina
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformador-beta
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRAF2</b>	Factor 2 asociado al receptor TNF
<b>TXNIP</b>	Proteína de interacción con tioredoxina
<b>UKPDS</b>	UK Prospective Diabetes Study
<b>UPR</b>	Respuesta a las proteínas mal plegadas
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión vascular 1

<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>XBP1</b>	Proteína de unión a X-box 1
<b>XO</b>	Xantina oxidasa

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>23</b>
1.1. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).....	25
1.1.1. Definición .....	25
1.1.2. Prevalencia .....	25
1.1.3. Fisiopatología .....	25
1.1.4. Control glicémico.....	27
1.1.5. Complicaciones vasculares de la DM2 .....	28
1.1.5.1. Cardiopatía isquémica silente.....	31
1.1.5.2. Nefropatía diabética.....	32
1.2. Procesos asociados al riesgo cardiovascular en la DM2 .....	33
1.2.1. Inflamación .....	33
1.2.2. Disfunción endotelial .....	34
1.2.3. Leucocitos: activación e interacción con el endotelio .....	34
1.2.4. Desarrollo de aterosclerosis .....	37
1.3. Mecanismos fisiopatológicos en la DM2.....	38
1.3.1. Estrés oxidativo .....	38
1.3.1.1. Generalidades .....	38
1.3.1.1.1. Definición .....	38
1.3.1.1.2. Mitocondria .....	38
1.3.1.1.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondriales.....	38
1.3.1.1.4. Producción de ERO en el citosol.....	40
1.3.1.1.4.1. Mieloperoxidasa (MPO).....	40
1.3.1.1.5. Mecanismos de defensa antioxidante.....	41
1.3.1.1.6. Disfunción mitocondrial.....	41
1.3.1.2. Papel del estrés oxidativo en la DM2 .....	43
1.3.1.2.1. Hiperglicemia y generación de ERO.....	43
1.3.1.2.2. Estrés oxidativo en las complicaciones vasculares de la DM2 ...	46
1.3.1.2.3. Defensas antioxidantes en la DM2.....	47
1.3.1.2.4. Disfunción mitocondrial en la DM2 .....	48
1.3.1.2.5. Papel de la MPO en la generación de ERO en el sistema cardiovascular .....	49
1.3.2. Estrés de retículo endoplasmático (RE).....	50
1.3.2.1. Retículo endoplasmático .....	50
1.3.2.2. Respuesta al mal plegamiento proteico .....	50
1.3.2.3. Estrés de RE en la DM2 .....	53

1.3.2.4. Relación del estrés de RE y la inflamación.....	54
1.3.2.5. Relación entre el estrés oxidativo y el estrés de RE .....	55
1.3.2.6. Estrés de RE y desarrollo de complicaciones vasculares .....	55
1.3.3. Autofagia.....	57
1.3.3.1. Mecanismo de acción .....	57
1.3.3.2. Autofagia en el contexto de enfermedad .....	58
1.3.3.3. Autofagia en la DM2 .....	59
1.3.3.4. Relación de la autofagia y el estrés celular .....	60
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>3. PUBLICACIONES .....</b>	<b>67</b>
3.1. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia.....	69
3.2. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes?.....	81
3.3. Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? .....	89
3.4. Is autophagy altered in the leukocytes of type 2 diabetic patients? .....	97
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>105</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>119</b>
<b>6. SHORT ENGLISH VERSION .....</b>	<b>123</b>
6.1. Introduction.....	125
6.2. Objectives.....	126
6.3. Methods.....	126
6.4. Results and conclusions .....	127
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>131</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>159</b>
Otras publicaciones con autoría durante el desarrollo de la tesis doctoral.....	161



# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1. Diabetes mellitus tipo 2

### 1.1.1. Definición

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un síndrome caracterizado por resistencia a la insulina (RI) que da lugar a múltiples alteraciones metabólicas entre las que destacan la hiperglucemia, la dislipemia y la obesidad, que a su vez mantienen una situación de inflamación crónica de bajo grado. Las consecuencias clínicas fundamentales son la microangiopatía específica del proceso diabético y un proceso de aterosclerosis difuso y acelerado.

### 1.1.2. Prevalencia

La DM2 es un gran problema de salud mundial, su prevalencia se ha incrementado dramáticamente en los últimos 30 años, alcanzándose proporciones epidémicas, especialmente en los países en desarrollo (Roglic G. *et al.*, 2000). Según la International Diabetes Federation se estima que había 387 millones de personas con DM2 a nivel mundial en 2014, y esta cifra alcanzaría los 592 millones en el año 2035 (Guariguata L. *et al.*, 2014). Se sabe que en la población obesa hay hasta cuatro veces más incidencia de DM2 que en los sujetos delgados, independientemente de la presencia o no de factores metabólicos de riesgo como elevados niveles de glucosa o triglicéridos, niveles reducidos de colesterol HDL o presión arterial alta (Twig G. *et al.*, 2014). A su vez, el riesgo de padecer DM2 aumenta con la edad y el desarrollo de la enfermedad aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), siendo ésta la mayor causa de mortalidad en pacientes con diabetes. De hecho, se ha descrito que los pacientes diabéticos sin antecedentes de cardiopatía isquémica tienen el mismo riesgo de sufrir infarto de miocardio que pacientes con ECV establecida (Haffner SM. *et al.*, 1998; Schramm TK. *et al.*, 2008). Además cuando la ECV está presente en un paciente con DM2, tiene un peor pronóstico y cursa de manera más agresiva que en sujetos no diabéticos (Conget I. *et al.*, 2009).

### 1.1.3. Fisiopatología

La correcta homeostasis de la glucosa implica la coordinación entre las acciones de varios órganos, como el intestino, el hígado y el músculo esquelético. En condiciones normales, tras la ingesta, la glucosa es absorbida en el intestino y liberada a la circulación, desde donde es captada por distintos tejidos, como el muscular, que

representa el principal regulador de los niveles de glucosa por su consumo. El hígado actúa como sensor de glucosa y equilibra a niveles óptimos la concentración de ésta mediante la gluconeogénesis cuando los niveles circulantes son bajos, y mediante su conversión a glucógeno cuando abunda la cantidad de glucosa circulante. Lo que ocurre en la DM2 es precisamente un desequilibrio en la regulación de la homeostasis de la glucosa por parte del hígado y el músculo esquelético.

El inicio de la DM2 está ligado a la obesidad principalmente causada por un exceso de ingesta calórica junto a un estilo de vida sedentario, aunque existe un componente genético que también influye. Bajo estas condiciones aparece la RI en músculo, hígado y tejido adiposo, y una mayor liberación de ácidos grasos libres a la circulación. Este aumento de ácidos grasos libres promueve el aumento de la gluconeogénesis hepática, y a su vez inhibe, a nivel muscular, la actividad de una enzima clave en la glicólisis, la piruvato deshidrogenasa, impidiendo así la utilización de la glucosa en este tejido. El resultado de estas alteraciones es una cantidad de glucosa en circulación por encima de los límites fisiológicos, es decir, una hiperglicemia (Bonadonna RC, *et al.*, 1992).

La hiperglicemia, sumada a la falta de respuesta sistémica a la insulina, desencadena que las células  $\beta$  del páncreas intenten compensar la deficiencia en la absorción de glucosa mediante el aumento de la producción y secreción de insulina. Cuando la demanda de insulina supera la capacidad de síntesis de las células  $\beta$  pancreáticas, éstas comienzan a sufrir una destrucción gradual activándose finalmente los mecanismos de apoptosis. Además, el estado inflamatorio subyacente a la obesidad hace que se infiltren células inmunitarias en los islotes pancreáticos y este mecanismo parece tener un papel importante en la fisiopatología de la DM2 (Weisberg SP. *et al.*, 2003). Parece que la liberación de señales proinflamatorias desde el tejido adiposo sería, al menos en parte, responsable del desarrollo de RI (Hotamisligil G. *et al.*, 1993).

Para evaluar el grado de resistencia a la insulina de un paciente, se valora el equilibrio entre los niveles de glucosa y de insulina circulantes mediante el cálculo del modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR), válido siempre y cuando el paciente no esté sometido a tratamiento con insulina.

#### 1.1.4. Control glicémico

En la práctica clínica el seguimiento de los pacientes con DM2 se lleva a cabo mediante la evaluación de los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), que estima los niveles medios de glucosa en sangre durante los últimos tres meses aproximadamente. Esta estimación permite evaluar de una forma cuantitativa el progreso de la enfermedad, así como la eficacia del tratamiento al que el paciente esté sometido. Entre los antidiabéticos orales más indicados en pacientes con DM2 destaca la metformina, cuyo mecanismo de acción consiste principalmente en la reducción de la gluconeogénesis hepática (Viollet B. *et al.*, 2012). También son de uso habitual aunque menos que la metformina, los fármacos secretagogos como los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), las sulfonilureas o las glinidas, cuyo mecanismo de acción es el de aumentar la secreción de insulina, y las tiazolidinedionas, que aumentan la sensibilidad a la insulina. Mediante la toma de estos fármacos, junto con unas pautas de alimentación y ejercicio adecuadas, se intenta controlar la glicemia en niveles óptimos. Sin embargo, cuando la progresión de la enfermedad desencadena el fallo de las células  $\beta$  pancreáticas, los pacientes requieren la administración de insulina para el control de la glucemia. De acuerdo con la “American Diabetes Association”, el mantenimiento de la HbA1c por debajo de 7% es clave para prevenir la aparición de complicaciones tanto microvasculares como macrovasculares (American Diabetes Association, 2012). Este hecho se sustenta en la demostración de que la aparición de complicaciones microvasculares está fuertemente ligada a la hiperglicemia continuada, así como el riesgo de padecer infarto de miocardio o ictus (Stratton IM. *et al.*, 2000). De hecho, el control glicémico a largo plazo es el mejor predictor de riesgo cardiovascular en los pacientes diabéticos. Uno de los estudios más relevantes, debido al tamaño de la población estudiada, 3867 pacientes con DM2, y a la duración del estudio, 10 años, es el “UK Prospective Diabetes Study” (UKPDS) que valora el efecto del descenso de HbA1c sobre el desarrollo y la progresión de complicaciones vasculares. En este estudio se observó que tras el tratamiento intensivo de los pacientes, bien con sulfonilurea o con insulina, las complicaciones microvasculares se reducían en un 25% cuando se alcanzaban unos niveles de HbA1c de 7% (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998). Recientemente se han publicado los resultados de otro ensayo realizado en 1791 pacientes con DM2, en el que de nuevo el tratamiento intensivo que permitía un control estricto de los niveles de glucosa durante 10 años redujo significativamente la aparición de eventos cardiovasculares (Hayward RA. *et al.*,

2015). Por lo tanto, existe una relación directa entre el estatus glicémico de los pacientes diabéticos y el riesgo cardiovascular. Además, se ha demostrado al comparar sujetos no diabéticos con individuos en distintas fases de la DM2 (pre-, recién diagnosticados y de larga duración) que existe una correlación positiva entre el grado de control glicémico (evaluado por la HbA1c, test de tolerancia a la glucosa y glucemia en ayunas) y el grosor de la íntima media carotídea, así como una mayor presencia de placas ateroscleróticas en los pacientes con DM2 establecida (Mostaza JM. *et al.*, 2015).

Es bien conocido que los efectos dañinos de la hiperglicemia están principalmente mediados por la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Brownlee M., 2005), por tanto, no es de extrañar que se haya demostrado que el mal control glicémico en pacientes con DM2 genera un aumento de estrés oxidativo (Cakatay U., 2005). Y no solo eso, sino que en pacientes bien controlados, los niveles de glucosa y de HbA1c se correlacionan positivamente con distintos marcadores de estrés oxidativo (Rytter E. *et al.*, 2009), destacando la importancia del control estricto de la glicemia en la DM2.

#### 1.1.5. Complicaciones vasculares de la DM2

Las consecuencias más relevantes de la DM2 son las complicaciones vasculares a largo plazo, que surgen a raíz de las elevaciones en los niveles de glucosa. El daño en vasos sanguíneos pequeños (capilares oculares, del riñón y del sistema nervioso) da lugar a las denominadas complicaciones microvasculares, y el daño en vasos mayores como las arterias (aorta, femoral y coronarias) ocasiona las denominadas complicaciones macrovasculares (Figura 1). Las complicaciones microvasculares incluyen la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía, y son más frecuentes que las complicaciones macrovasculares, especialmente la nefropatía (Deshpande AD. *et al.*, 2008; Raman R. *et al.*, 2012). Sin embargo, las principales causas de mortalidad en pacientes con DM2 son las complicaciones macrovasculares tales como la enfermedad cerebrovascular, la angina estable y el infarto de miocardio, representando en conjunto un 52% de las muertes en pacientes con DM2 (Morrish NJ. *et al.*, 2001). En las fases iniciales de la enfermedad cardiovascular, las manifestaciones más comunes son la enfermedad arterial periférica y el fallo cardíaco (Shah AD. *et al.*, 2015). El proceso de aterosclerosis es clave en este contexto, y de gran importancia dado que se estima que alrededor del 80% de las muertes en pacientes diabéticos están vinculadas a la aterosclerosis (Aronson D. *et al.*, 2002).

Además de los factores de riesgo cardiovascular clásicos como el tabaquismo, la hipertensión y la hipocolesterolemia, en los pacientes con DM2, la RI y la hiperglicemia incrementan el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares adversos (Laakso M. *et al.*, 2014). Sin embargo, desvelar el mecanismo concreto mediante el cual la DM2 incrementa el riesgo de ECV sigue siendo objetivo principal para la investigación clínica y básica. Es muy importante el estudio de los procesos moleculares que preceden a la ECV y originan las alteraciones en el sistema cardiovascular. Con lo cual, es fundamental que anticipándose al desarrollo de la ECV, se examinen en profundidad los tipos celulares que participan en el proceso de aterosclerosis, como por ejemplo las células endoteliales o los leucocitos de sangre periférica. La comprensión de las alteraciones subyacentes a la DM2 en estos tipos celulares podría favorecer el desarrollo de nuevas terapias para prevenir el riesgo cardiovascular de estos pacientes.

Entre las complicaciones macrovasculares de la DM2, la cardiopatía isquémica representa una de las más relevantes, puesto que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población diabética. La presencia de cardiopatía isquémica puede manifestarse como angina estable o inestable, o bien infarto agudo de miocardio. Es por ello que en esta Tesis Doctoral nos centramos en esta alteración para profundizar en los mecanismos moleculares que podrían estar relacionados con las complicaciones macrovasculares de la DM2.

En cuanto a las complicaciones microvasculares, la nefropatía diabética ocurre de manera progresiva durante la DM2 en una gran proporción de pacientes y es la principal causa de insuficiencia renal. Esta patología puede conducir al paciente a depender de diálisis para suplir la función renal afectada, pudiendo en el peor de los casos desencadenar un fallo renal. Es por ello de especial importancia el estudio de las bases fisiopatológicas que participan en la aparición y el desarrollo de nefropatía diabética. Por tanto, escogimos esta complicación microvascular para investigar qué procesos ocurren en el endotelio del glomérulo renal a nivel intracelular y que precederían al desarrollo de nefropatía.

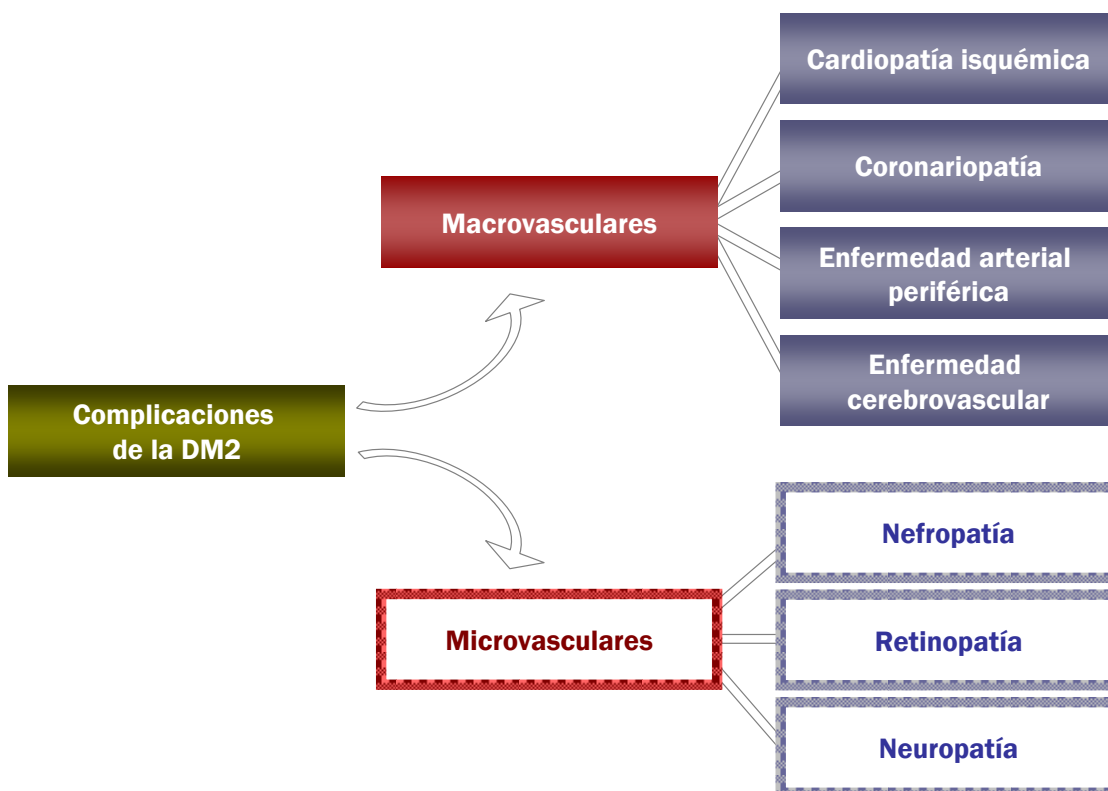


Figura 1. Complicaciones crónicas derivadas de la DM2. La hiperglicemia crónica causa el desarrollo de alteraciones vasculares. La aceleración de la aterosclerosis a nivel macrovascular en las arterias que aportan sangre al corazón, a las extremidades inferiores o al cerebro da lugar a la aparición de cardiopatía isquémica, coronariopatía, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular. A nivel microvascular se pueden desarrollar alteraciones en el riñón, la retina y los nervios periféricos ocasionando nefropatía, retinopatía y neuropatía diabéticas, respectivamente.

### 1.1.5.1. Cardiopatía isquémica silente

No siempre se dan manifestaciones aunque exista cardiopatía subyacente, esta situación de ECV subclínica se denomina cardiopatía isquémica silente (CIS). La CIS se detecta en pacientes asintomáticos, pero que presentan evidencias de cardiopatía isquémica como descensos en los segmentos ST al realizarse una prueba de esfuerzo o alteraciones en la contractilidad y/o en la perfusión miocárdica (Conti CR. *et al.*, 2012; Cohn PF. *et al.*, 2003). La evaluación de la función ventricular izquierda así como las calcificaciones en la válvula aórtica mediante ecocardiografía permite detectar la cardiopatía subclínica en pacientes con DM2 asintomáticos (Faden G. *et al.*, 2013). La prevalencia de CIS en pacientes con DM2 oscila entre el 15% y el 30% según los distintos estudios, a pesar de esta variabilidad es evidente que su prevalencia es mayor que en la población general (Scheidt-Nave C. *et al.*, 1990; Naka M. *et al.*, 1992). El mecanismo fisiopatológico de la CIS parece ser un suministro insuficiente de oxígeno (O<sub>2</sub>) al miocardio en situaciones de elevada demanda, probablemente debido a una respuesta microvascular y endotelial alterada (Conti CR. *et al.*, 2012). Sin embargo, la mayoría de estudios realizados en pacientes con CIS centran la atención en determinar la prevalencia y los métodos adecuados de pronóstico, y son más escasos los estudios de investigación básica de los procesos moleculares subyacentes a la CIS.

En modelos animales de diabetes, se ha demostrado la presencia de RI en el corazón, donde se observa una captación de glucosa drásticamente disminuida en respuesta a insulina (Desrois M., 2004). Esta anomalía puede alterar la función mitocondrial, que es esencial en el tejido cardíaco, dado su elevado requerimiento energético para el correcto funcionamiento. Se sabe que la anulación de la señalización por insulina en los cardiomiocitos genera una disfunción mitocondrial que ocasiona una disminución de la capacidad contráctil de estas células (Boudina S. *et al.*, 2009). Esto podría explicar cómo la RI en sujetos con DM2 desencadenaría anomalías en la función cardíaca que podrían desencadenar un fallo cardíaco. La prevención de estas anomalías constituye uno de los principales objetivos en la práctica clínica, para lo cual se requiere conocer en detalle los procesos fisiopatológicos que desencadena la hiperglicemia en la DM2 y que preceden a la aparición de la cardiopatía.

#### 1.1.5.2. Nefropatía diabética

La complicación microvascular más común en la población diabética es la nefropatía, que se desarrolla en aproximadamente el 40% de los pacientes y se manifiesta clínicamente con niveles elevados de albúmina en orina (albuminuria), así como en un descenso en la tasa de filtrado glomerular (Rossing K. *et al.*, 2004). En función de la cantidad de albúmina excretada se habla de microalbuminuria (30-299  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinina) o macroalbuminuria ( $\geq 300$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinina). La estimación de los valores de filtrado glomerular se calcula a partir del valor de creatinina en suero corrigiendo por factores como la edad, el sexo o la raza. Se considera indicativo de disfunción renal cuando el filtrado glomerular estimado es menor a  $60 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$  (Utrecht GA. *et al.*, 2012). El desarrollo de nefropatía durante el curso de la DM2 se produce especialmente en pacientes con mal control glicémico, hipertensión, colesterol alto, inflamación y predisposición genética, los cuales pueden llegar a desarrollar enfermedad renal crónica (Satirapoj B. *et al.*, 2014). Es importante además tener en cuenta que la albuminuria y el filtrado glomerular son factores de riesgo independientes de mortalidad y enfermedad cardiovascular, y que en estados avanzados de nefropatía el riesgo de enfermedad cardiovascular es extremadamente elevado (Sasso FC. *et al.*, 2011).

El desarrollo y la progresión de la nefropatía son procesos bastante complejos debido a la diversidad de tipos celulares que existen en el riñón y la variedad de funciones que desempeña este órgano. A nivel fisiopatológico, lo que ocurre en el glomérulo renal es que la hiperglicemia causa daño al glicocáliz vascular, que funciona como barrera sangre-endotelio y regula la permeabilidad a macromoléculas, lo cual es crucial para la correcta función del glomérulo. Debido a los niveles elevados de glucosa, se desencadena la liberación de radicales libres que dañan el endotelio glomerular. Como consecuencia se produce una hiperperfusión y una hiperfiltración glomerular, que provocan una salida de albúmina desde los capilares glomerulares. Además ocurren una serie de cambios estructurales en el glomérulo, como el engrosamiento de la membrana basal, la hipertrofia glomerular, la glomerulosclerosis, la expansión de las células mesangiales y el daño y la pérdida de podocitos (Forbes JM. *et al.*, 2013; Jefferson JA. *et al.*, 2008). A pesar de la gran cantidad de estudios que evalúan la aparición de nefropatía en la DM2 y el papel que juega el estrés oxidativo en su desarrollo, poco se sabe acerca del origen del daño oxidativo a nivel microvascular que precede a las alteraciones renales en los pacientes diabéticos.



## 1.2. Procesos asociados al riesgo cardiovascular en la DM2

### 1.2.1. Inflamación

El desequilibrio metabólico presente en la DM2 está asociado con un estado inflamatorio constante y de bajo grado, representado por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en sangre como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleuquina 6 (IL6), que son liberadas fundamentalmente por los leucocitos activados, hepatocitos y adipocitos (Giulietti A. *et al.*, 2007). Además de estas citoquinas, la proteína C reactiva (PCR) es otro importante marcador de inflamación sistémica. El papel que juega la inflamación en la DM2 es crucial. De hecho, las citoquinas proinflamatorias junto con los ácidos grasos son moléculas clave en el desarrollo de RI (Kahn SE. *et al.*, 2006; Petersen KF. *et al.*, 2006). Se sabe que la inhibición de la señalización por insulina es consecuencia de la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS), que está mediada por la quinasa c-jun n-terminal (JNK) y el inhibidor de la quinasa kappa beta (IKK $\beta$ ). Esta fosforilación de IRS impide la señalización que desencadena el receptor de insulina en respuesta a la unión de ésta (Wellen KE. *et al.*, 2005). Tanto TNF $\alpha$  como IL6 están implicadas en la inhibición de la acción de la insulina, dado que por una parte participan en la fosforilación de IRS y por otra parte inducen una reducción en la expresión del receptor de glucosa dependiente de insulina, GLUT4 (Rui L. *et al.*, 2001; Stephens JM. *et al.*, 1997; Leguisamo NM. *et al.*, 2012). La correlación que existe entre los niveles de TNF $\alpha$ , IL6, PCR y la RI se ha descrito en numerosos estudios (Hotamisligil G. *et al.*, 1993; Pickup JC. *et al.*, 1997; Festa A. *et al.*, 2000; Bastard JP. *et al.*, 2013). Un regulador clave de la señalización proinflamatoria es el factor nuclear kappa b (NF- $\kappa$ B), cuya función principal es la de activar la transcripción de diversas proteínas, entre las que se incluyen citoquinas y moléculas de adhesión (Ghosh S. *et al.*, 1998). Este complejo proteico fue relacionado por primera vez con la DM2 al descubrirse que el tratamiento con salicilatos (que inactivan la señalización por NF- $\kappa$ B) es capaz de revertir la RI en un modelo murino de obesidad (Yuan M. *et al.*, 2001). NF- $\kappa$ B se activa en el hígado, como consecuencia de la obesidad y de una dieta rica en grasas, donde estimula la liberación de citoquinas al torrente sanguíneo contribuyendo al desarrollo de RI a nivel sistémico (Cai D. *et al.*, 2005).

Por otro lado, el desarrollo de problemas cardiovasculares está relacionado con este proceso inflamatorio principalmente debido a que la liberación de citoquinas proinflamatorias a la circulación promueve la atracción de los leucocitos hacia las

paredes vasculares, paso inicial en el proceso de formación de placas ateroscleróticas (Libby P., 2006). En este sentido, se ha observado que los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias se asocian a un incremento en el riesgo de complicaciones macro- y microvasculares, así como a un aumento de la mortalidad derivada de la enfermedad cardiovascular (Ridker PM. *et al.*, 2000; Lowe G. *et al.*, 2014; Harris TB. *et al.*, 1999). En particular la PCR, proteína reactante de fase aguda que es sintetizada en el hígado en respuesta a la inflamación sistémica, se considera como uno de los mejores marcadores que predicen la aparición de eventos cardiovasculares (Kaptoge S. *et al.*, 2012). Además, esta proteína junto con TNF $\alpha$ , IL6 y las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) e intercelular (ICAM-1) son considerados los principales marcadores pronósticos y de progresión de la DM2 (Tousoulis D. *et al.*, 2013).

Todas estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de la inflamación en la etiología de la DM2.

#### 1.2.2. Disfunción endotelial

El endotelio cumple las funciones de regulación del tono vascular, trombogénesis e inflamación de los vasos sanguíneos. En el endotelio, el óxido nítrico (NO) es sintetizado por la NO sintasa endotelial (eNOS), regula la vasodilatación y mantiene el tono vascular basal. La alteración de estas funciones se presenta en la enfermedad cardiovascular y se conoce como disfunción endotelial (Feletou M. *et al.*, 2006). La disfunción endotelial está caracterizada por desequilibrios entre factores pro- y antioxidantes, pro- y antitrombóticos, y pro- y antiinflamatorios. Ésta disfunción promueve la aparición de trombosis, vasoconstricción, infiltración leucocitaria y proliferación celular en las paredes vasculares (Mikhed Y. *et al.*, 2015). En esta alteración de la homeostasis del endotelio, el estrés oxidativo promovido fundamentalmente por la hiperglicemia juega un papel principal (Apostolova N. *et al.*, 2014).

#### 1.2.3. Leucocitos: activación e interacción con el endotelio

La activación crónica del sistema inmunitario y la función alterada de las células inmunitarias son características comunes de la DM2, y en los últimos años han ganado importancia en la fisiopatología de la enfermedad. De hecho, la alteración de la señalización inflamatoria en las células de sangre periférica se ha visto directamente relacionada con el desarrollo de RI, destacándose así el rol primordial que ejercen los

leucocitos en la etiología de la DM2 (Sourris KC. *et al.*, 2009; Vozarova B. *et al.*, 2002). Por ejemplo, se ha demostrado que la acción de la proteína IKK $\beta$ , que fundamentalmente participa en la activación de NF- $\kappa$ B desencadenando una respuesta inflamatoria, es la responsable en los leucocitos de promover la RI sistémica en respuesta a una dieta rica en grasa o a la obesidad (Arkan MC. *et al.*, 2005). También se ha demostrado que la actividad NF- $\kappa$ B en células mononucleares de sangre periférica está inversamente relacionada con la sensibilidad a la insulina (Sourris KC. *et al.*, 2009).

Debido a la inflamación sistémica en la DM2, existen niveles elevados de leucocitos activados en sangre y, por tanto, hay un aumento en la interacción de éstos con el endotelio vascular y una gran liberación de ERO, lo cual podría estar contribuyendo a la aparición de aterosclerosis prematura.

En los procesos inflamatorios, el reclutamiento de los leucocitos comienza cuando éstos disminuyen su velocidad en el flujo sanguíneo, se aproximan y ruedan sobre las paredes endoteliales para finalmente adherirse a ellas y migrar a través del endotelio hacia el foco de infección (Carlos TM. *et al.*, 1994; Leick M. *et al.*, 2014). Este proceso está regulado por la liberación de quimiocinas, que son citoquinas que inducen quimiotaxis desde las células endoteliales y cuyos receptores en leucocitos facilitan la aproximación de éstos hacia las paredes vasculares (Drechsler M. *et al.*, 2015). En cuanto al proceso de interacción directa, en las células endoteliales existen las llamadas moléculas de adhesión celular (CAM) que son proteínas de superficie que se unen a receptores específicos situados en los leucocitos circulantes. Entre ellas están las selectinas, que facilitan la atracción inicial hacia el endotelio, y en concreto la E-selectina que participa en el proceso inicial de rodamiento de los leucocitos, posteriormente VCAM-1 e ICAM-1 median la adhesión firme (Schnoor M., 2015). La VCAM-1 e ICAM-1 son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresan en las células endoteliales de las arterias en regiones predispuestas a la aterosclerosis (Dansky HM. *et al.*, 2001). Su acción es la de promover el acercamiento de los leucocitos hacia las células endoteliales y facilitar su migración a través de espacios intercelulares (Figura 2). Principalmente, el estímulo que desencadena la activación de estas moléculas es el estrés oxidativo, promoviéndose como consecuencia la interacción entre leucocitos y endotelio (Cook-Mills JM. *et al.*, 2011; Alom-Ruiz SP. *et al.*, 2008).

Las moléculas de adhesión se pueden encontrar libres en suero y plasma, siendo fáciles de cuantificar, lo que ha permitido que numerosos estudios hayan evaluado su expresión y su relación con el desarrollo de la DM2 y de ECV (Meigs JB. *et al.*, 2004; Hope SA. *et al.*, 2003). También se han visto niveles elevados de estas moléculas en las placas ateroscleróticas, lo cual indica que participan en el proceso aterosclerótico que precede la ECV (O'Brien KD. *et al.*, 1993; Dansky HM. *et al.*, 2001). Además las moléculas de adhesión parecen estar también implicadas en el desarrollo de nefropatía diabética, debido a que favorecen la infiltración de macrófagos en los tejidos renales (Navarro-González JF. *et al.*, 2011).

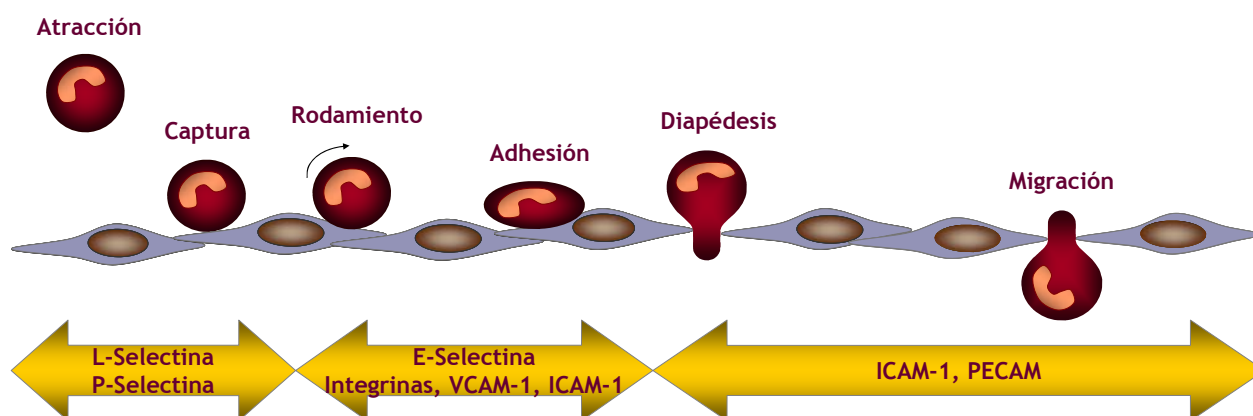


Figura 2. Reclutamiento de los leucocitos hacia la pared del endotelio en situaciones de inflamación. Las primeras etapas del proceso son la atracción inicial y la captura de los leucocitos, fases en las que participan principalmente las moléculas de L-selectina y P-selectina. A continuación, los leucocitos ruedan sobre las células endoteliales, proceso mediado principalmente por la E-selectina, hasta que se detienen y se adhieren, lo cual está regulado por las integrinas, VCAM-1 e ICAM-1. Finalmente ocurre la extravasación de los leucocitos y la migración hacia el foco de infección, mediado por ICAM-1 y PECAM.

El estudio de este proceso de reclutamiento de leucocitos hacia las paredes vasculares en pacientes con DM2 es de gran interés dado que permitiría determinar la manera en que la DM2 predispone a la aparición de alteraciones cardiovasculares. Además la identificación de los procesos que aumentan la atracción de los leucocitos hacia el endotelio en los pacientes diabéticos es un campo a explorar que ayudaría a comprender el origen del riesgo cardiovascular en estos pacientes, pudiendo contribuir al desarrollo de estrategias de prevención.

#### 1.2.4. Desarrollo de aterosclerosis

La DM2 suele ir acompañada de un perfil lipídico alterado, con elevados niveles de LDL, que junto con el estado de estrés oxidativo da lugar a LDL oxidadas con un alto potencial aterogénico. La presencia de estas partículas favorece la secreción de quimiocinas por parte del endotelio, así como la expresión de moléculas de adhesión que inducen el reclutamiento de monocitos en las paredes vasculares. Estos monocitos migran al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos y comienzan a acumular colesterol y ácidos grasos convirtiéndose en células espumosas que son las que finalmente formarán parte de la placa aterosclerótica (Berliner JA. *et al.*, 1995). Debido a que la DM2 induce un aumento en el reclutamiento de monocitos hacia las paredes vasculares, las placas ateroscleróticas de los pacientes con DM2 presentan más macrófagos infiltrados en comparación con las de individuos no diabéticos (Moreno PR. *et al.*, 2000). Las células espumosas se caracterizan por su elevada carga lipídica, y contribuyen al proceso aterosclerótico liberando citoquinas proinflamatorias que mantienen la inflamación vascular e inducen la proliferación de las células del músculo liso. Este proceso ocurre de forma continua y puede tener consecuencias fatales. En el peor de los casos, cuando la placa se forma en arterias coronarias, se puede desencadenar angina estable, infarto de miocardio e incluso la muerte por fallo cardíaco (Tabas I., 2010).

### 1.3. Mecanismos fisiopatológicos en la DM2

#### 1.3.1. Estrés oxidativo

##### 1.3.1.1. Generalidades

###### 1.3.1.1.1. Definición

El estrés oxidativo se define como una condición en la que existe una excesiva liberación de radicales libres, principalmente derivados del  $O_2$ , que excede la capacidad antioxidante de la célula. La producción de radicales libres ocurre tanto a nivel citosólico como a nivel mitocondrial.

###### 1.3.1.1.2. Mitocondria

La mitocondria es el orgánulo encargado de generar la mayor parte de la energía celular mediante el mecanismo de fosforilación oxidativa. Este proceso está mediado por los cuatro complejos de transferencia de electrones (I - IV) integrados en la membrana interna mitocondrial, formando la cadena de transporte de electrones (CTE) o cadena respiratoria. Los electrones llegan en forma de NADH y  $FADH_2$ , provenientes de las dos rutas principales de obtención de energía, que son el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. En presencia de  $O_2$ , la reducción de  $H_2O$  en la CTE para la obtención de energía genera un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. Finalmente este gradiente electroquímico es aprovechado por la ATP sintasa, también denominada complejo V, para la síntesis de ATP (Elston T. *et al.*, 1998).

Además de su papel en la generación de energía, la mitocondria participa en otros procesos celulares cruciales, como la regulación de la homeostasis de calcio, la apoptosis y la producción de ERO.

###### 1.3.1.1.3. Producción de ERO mitocondriales

Las mitocondrias representan la mayor fuente de ERO de las células, siendo los complejos I y III de la CTE los principales generadores. A pesar de que la mayor parte del  $O_2$  es completamente consumido en el proceso de la fosforilación oxidativa, una pequeña parte (1-2%) se convierte en anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en los complejos I y III

de la CTE. A partir de este paso se forman otras ERO como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), generado por la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mediada por la manganosa superóxido dismutasa (MnSOD), y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que se obtiene por la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de metales de transición reducidos (Dröge W., 2002) (Figura 3).

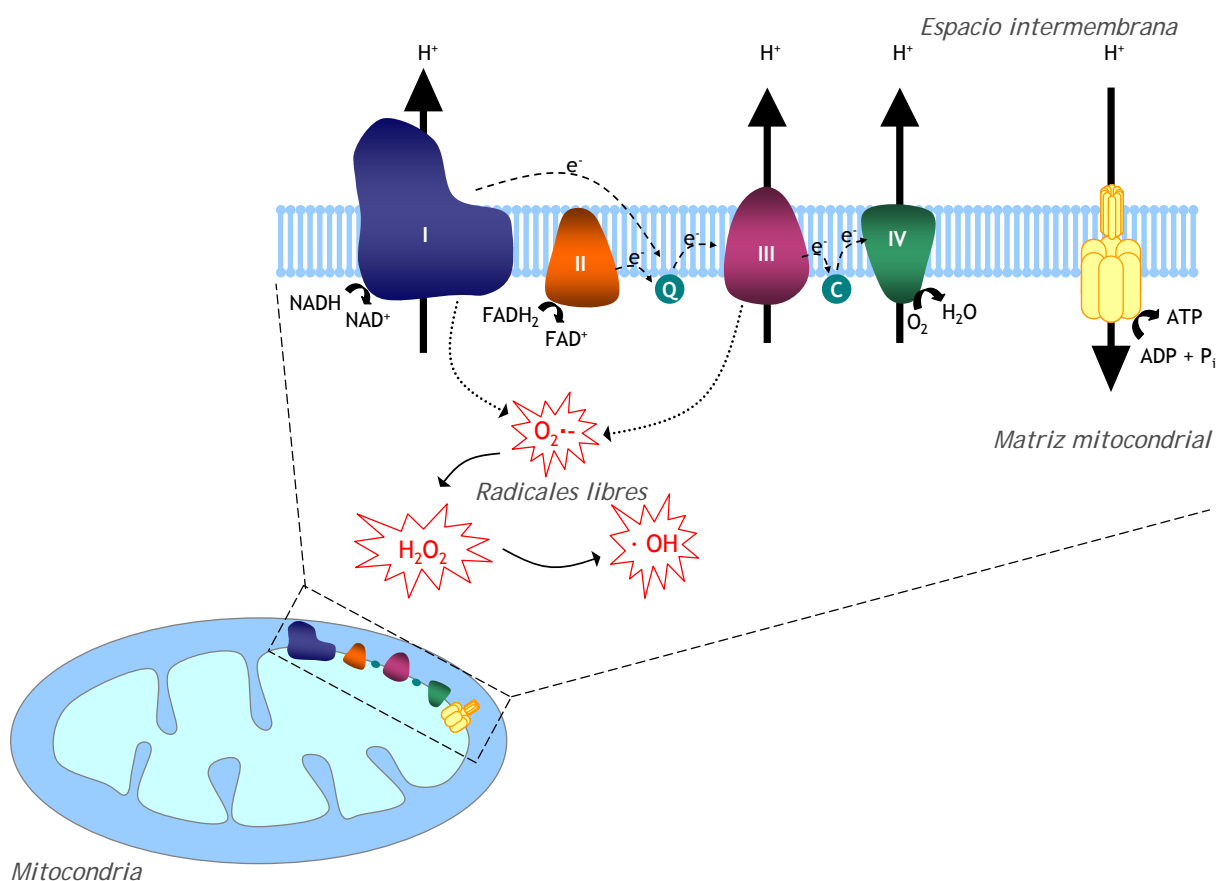


Figura 3. Producción de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La fosforilación oxidativa es llevada a cabo en la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra la cadena de transporte de electrones formada por los complejos I, II, III y IV, el coenzima Q (Q) y el citocromo C (C). La actividad de los complejos I, III y IV genera un gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) que favorece la entrada de éstos a través de la ATP sintasa, que genera ATP a partir de  $\text{ADP} + \text{P}_i$ . De los complejos I y III además, se libera el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), uno de los principales radicales libres de origen mitocondrial, junto con sus derivados, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).  $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ , nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida / oxidada);  $\text{FADH}_2 / \text{FAD}^+$ , flavina adenina dinucleótido (forma reducida / oxidada);  $\text{O}_2$ , oxígeno;  $\text{H}_2\text{O}$ , agua; ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato;  $\text{P}_i$ , fosfato inorgánico. (Obtenida de Rocha M. *et al.*, 2014).

Además de ERO, en la mitocondria se forman también especies reactivas de nitrógeno (ERN), como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) formado a partir del óxido nítrico que reacciona con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Tanto las ERO como las ERN se producen bajo metabolismo aeróbico y actúan como moléculas de señalización relevantes para diversas funciones

celulares en condiciones fisiológicas, como la muerte celular programada, la regulación de respuestas a estrés, la proliferación celular o como sensores de la concentración de O<sub>2</sub> (Dröge W., 2002; Brookes PS. *et al.*, 2002). Un ejemplo del papel esencial de las ERO en el mantenimiento de ciertas funciones celulares es la liberación de insulina por parte de las células β pancreáticas en respuesta a la glucosa, que requiere una moderada y equilibrada producción de ERO mitocondriales (Leloup C. *et al.*, 2009). Sin embargo si la producción de ERO es excesiva puede dañar moléculas como el ADN y las proteínas, generándose un estado de estrés oxidativo perjudicial para la célula.

#### 1.3.1.1.4. Producción de ERO en el citosol

Las mitocondrias no son la única fuente de ERO, ya que existen en la célula diversas enzimas que son capaces de producir ERO, como la NADPH oxidasa. Esta enzima está formada por varios complejos proteicos y juega un rol crucial en la defensa inmunitaria, al generar ERO en las células fagocíticas para eliminar los microorganismos patógenos (Segal AW. *et al.*, 1997; Geiszt M. *et al.*, 2004). La NADPH oxidasa está expresada en múltiples tipos celulares, pero es de particular importancia su función en el sistema vascular, ya que actúa regulando el tono vascular y como sensor de O<sub>2</sub> (Cave AC. *et al.*, 2006). Sin embargo, su excesiva generación de ERO en este tejido se ha visto implicada en diversas enfermedades vasculares (Zafari AM. *et al.*, 1998).

Otros ejemplos de enzimas generadoras de ERO son la xantina oxidasa (XO), la lipooxigenasa o la NO sintasa, así como la mieloperoxidasa (MPO), que se encarga de la producción de ERO como mecanismo defensivo en las células inmunitarias (Kelley EE. *et al.*, 2010; Brash AR., 1999; Sugamura K. *et al.*, 2011).

##### 1.3.1.1.4.1. Mieloperoxidasa

La MPO es una enzima peróxido de hidrógeno oxidoreductasa derivada fundamentalmente de los leucocitos, tanto neutrófilos como monocitos. En los neutrófilos la enzima se encuentra localizada a nivel lisosomal en los gránulos azurófilos, donde ejerce su actividad antimicrobiana. Su precursor enzimáticamente inactivo consta de una sola cadena, que posteriormente es cortada dando lugar a la enzima madura, constituida por una cadena ligera y otra cadena pesada. La MPO cataliza la reacción de formación del ácido hipocloroso a partir del ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este potente agente bactericida es requerido en las células inmunitarias para



neutralizar a los patógenos. Al ser excretada durante procesos inflamatorios, la MPO contribuye a través de la formación de ácido hipocloroso, a la generación de ERO, ejerciendo un papel esencial en la inmunidad innata (Winterbourn CC. *et al.*, 2000).

Generalmente la deficiencia total o parcial de MPO no se manifiesta con un mayor riesgo de infecciones, por lo que otros mecanismos independientes de defensa inmunitaria cumplen esta misma función. No obstante, los individuos con una deficiencia total de esta enzima manifiestan una elevada incidencia de tumores malignos, planteándose así un posible rol de la MPO en el control de la aparición y desarrollo de tumores (Lanza F., 1998).

Sin embargo, la MPO no siempre participa en funciones beneficiosas para el organismo, puesto que un exceso en su actividad generaría tal cantidad de ERO que rompería el equilibrio redox, pudiendo liberarse a la circulación y dañar el endotelio. De hecho, desequilibrios en la cantidad y/o actividad de la MPO se han relacionado con el desarrollo de ECV y, además, son bien conocidos sus efectos proaterogénicos (Klebanoff SJ., 2005). El papel de la MPO en el daño al sistema cardiovascular será descrito en profundidad más adelante.

#### 1.3.1.1.5. Mecanismos de defensa antioxidante

La producción de ERO se compensa normalmente por los sistemas antioxidantes, que neutralizan los efectos tóxicos de los radicales libres, manteniendo un equilibrio redox apropiado. Antioxidantes celulares como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxiredoxina, tioredoxina y el glutatión reducido son los principales miembros de esta barrera defensiva (Brown DI. *et al.*, 2015). Y no menos importante es el papel que juega el mecanismo regulador de la transcripción de genes antioxidantes gobernado por el factor de transcripción nuclear E2 y el elemento de respuesta antioxidante (Nrf2/ARE), y regulado por el equilibrio redox celular (Cheng X. *et al.*, 2011). La producción excesiva de ERO junto con una reducción de las defensas antioxidantes ocasionan el estado de estrés oxidativo, el cual subyace al proceso de envejecimiento así como la patogénesis de numerosas enfermedades, entre ellas la DM2.

#### 1.3.1.1.6. Disfunción mitocondrial

El término disfunción mitocondrial hace referencia a cualquier alteración de la fisiología de la mitocondria que produzca una descompensación de las funciones

reguladoras que ésta realiza, como la obtención de ATP, la regulación de la homeostasis del calcio, la síntesis y catabolismo de metabolitos, o la generación y detoxificación de radicales libres (Rocha M *et al.*, 2014).

Dado que las mitocondrias están continuamente generando ERO, la inmediata y constante exposición a éstas hace que los componentes mitocondriales, como el ADN mitocondrial, las proteínas o las membranas sean especialmente sensibles a su efecto deletéreo. Por una parte, el ADN mitocondrial acumula mucho más daño oxidativo que el ADN nuclear debido a su proximidad a las fuentes generadoras de ERO, pero también debido a unos sistemas de reparación menos eficaces y a la ausencia de histonas que protegen físicamente el ADN de ataques exógenos (Martin LJ., 2012). Por otra parte, las proteínas mitocondriales también son particularmente susceptibles al daño oxidativo debido a la presencia de grupos de iones sulfuro en su estructura, que son susceptibles a inactivarse por oxidación, así como los residuos tiólicos que son más vulnerables a S-nitrosilación mediada por las ERN (Dahm CC. *et al.*, 2006). Así, las proteínas que integran los complejos mitocondriales de la CTE pueden verse afectadas por la producción de ERO. Particularmente el complejo I es el más vulnerable, y su alteración, en consecuencia, incrementa la producción de ERO, creándose un círculo vicioso que da lugar a la disfunción mitocondrial. Es importante destacar que el daño al complejo I tiene un mayor impacto en la función mitocondrial que la alteración a otros complejos, dado que las mitocondrias poseen menos cantidad de complejo I que del resto de complejos de la CTE (Musatov A. *et al.*, 2012). Finalmente, las membranas mitocondriales son otra diana del daño oxidativo. Es bien sabido que los fosfolípidos que integran las membranas mitocondriales son ricos en ácidos grasos insaturados, que son extremadamente susceptibles a la peroxidación lipídica mediada por las ERO. Uno de los lípidos más afectados por el daño oxidativo es la cardiolipina, un componente esencial de la membrana mitocondrial interna que además se asocia a los complejos mitocondriales, probablemente favoreciendo la comunicación entre ellos (Haines TH. *et al.*, 2002). El daño inducido por ERO en la membrana mitocondrial interna es particularmente relevante, no solo porque ésta integra los complejos mitocondriales, sino también porque mantiene un elevado potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) necesario para mantener su gradiente electroquímico. Estas propiedades se pueden ver comprometidas por la acción oxidativa de las ERO y la energía obtenida por respiración mitocondrial se disipa a través de la fuga de  $H^+$  (Skulachev VP., 2013).

La correcta función mitocondrial se manifiesta con una tasa equilibrada de producción de ATP, que implica el consumo apropiado de O<sub>2</sub> en la CTE mitocondrial, el cual fluctúa en función de los requerimientos energéticos. A su vez, el potencial de membrana mitocondrial es un indicador de la función de la mitocondria puesto que representa el equilibrio entre el potencial de reducción de las bombas de protones en la CTE y la conductividad iónica de la membrana hacia la matriz mitocondrial (Perry CGR. *et al.*, 2013).

#### 1.3.1.2. Papel del estrés oxidativo en la DM2

Un gran número de estudios respaldan que el estrés oxidativo es un mecanismo crucial en la patogénesis de la DM2, así como en las complicaciones vasculares asociadas (Brownlee M., 2001; Schaffer SW. *et al.*, 2012). En la DM2 está bastante aceptada la hipótesis de que la mayor fuente de estrés oxidativo es la generación de O<sub>2</sub><sup>••</sup>, tanto mitocondrial por la CTE, como citosólico derivado de la NADPH oxidasa (Schaffer SW. *et al.*, 2012).

##### 1.3.1.2.1. Hiperglicemia y generación de ERO

El estímulo que promueve la inducción de estrés oxidativo en la DM2, aunque no es el único pero sí el más relevante, es la elevada concentración de glucosa. Un aumento de glucosa de 5 a 30 mmol/l en células endoteliales en cultivo genera un incremento significativo en la producción de ERO citosólicos (Nishikawa T. *et al.*, 2000). Se ha descrito que el proceso mediante el cual la glucosa promueve un estado de estrés oxidativo que deriva en alteraciones en el sistema vascular está mediado por cuatro vías de señalización: la generación de productos avanzados de glicosilación (en inglés AGEs), la activación de la proteína quinasa C (PKC), la conversión de glucosa a sorbitol y la señalización por hexosamina (Brownlee M., 2005). Todas estas vías de señalización son activadas como consecuencia de la inhibición de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que participa en la glicólisis convirtiendo el gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato. La inhibición de GAPDH está mediada por la excesiva producción de ERO, y hace que se acumulen ciertos precursores de la vía glicolítica, como la fructosa-6-fosfato o el gliceraldehído-3-fosfato. Todo esto desencadena la activación de las cuatro vías de señalización mencionadas, que en condiciones de normoglicemia serían insignificantes pero que al haber un exceso de glucosa representan las principales

formas de metabolismo de ésta y contribuyen al daño vascular (Figura 4) (Brownlee M., 2001).

Los AGEs se forman tanto a nivel intracelular como extracelular debido al ambiente hiperglicémico en la DM2, al reaccionar el metabolito metilglioxal (formado a partir del gliceraldehído-3-fosfato) con ciertas proteínas, glicosilando sus grupos amino. Aunque los principales AGEs son las proteínas, también pueden sufrir alteraciones por glicosilación los lípidos y ácidos nucleicos. Estos AGEs son perjudiciales tanto porque las proteínas así modificadas dejan de ser funcionales, como porque al unirse a su receptor (RAGE) son capaces de inducir la producción de ERO citosólicos y mitocondriales (Brownlee M., 2005; Coughlan MT. *et al.*, 2009). El incremento de AGEs estimado en un paciente con diabetes se relaciona con la presencia de complicaciones asociadas, siendo mucho mayor en pacientes con complicaciones tales como la enfermedad arteriocoronaria o la nefropatía, que en pacientes con DM2 sin ninguna complicación (Huebschmann AG. *et al.*, 2006). La presencia de estos AGEs de manera excesiva se ha relacionado con defectos en la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas, debido a la inducción de disfunción mitocondrial (Coughlan MT. *et al.*, 2011). Los AGEs no solo se forman de manera endógena en el organismo, sino que pueden venir asociados a la dieta, ya que se pueden formar en los alimentos como consecuencia de su procesado. Estos AGEs adquiridos podrían estar sumando efectos nocivos sobre pacientes con DM2, dado que al restringir su ingesta se consigue mejorar la sensibilidad a la insulina y el nivel de inflamación en pacientes diabéticos (Uribarri J. *et al.*, 2011).

La activación de la PKC es un mecanismo clave en el desarrollo de complicaciones de la diabetes que también depende del estrés oxidativo derivado de la hiperglicemia. La PKC se activa a elevadas concentraciones intracelulares de glucosa, que aumentan la síntesis de novo de diacilglicerol induciendo así su actividad. Participa en diversas rutas de señalización del sistema vascular, como la angiogénesis (activando el factor de crecimiento vascular endotelial) o la inflamación (promoviendo la actividad de NF- $\kappa$ B). La PKC potencia el desacoplamiento de la eNOS y además activa la NADPH oxidasa, generando una mayor acumulación de radicales libres (Inoguchi T. *et al.*, 2000; Nishikawa T. *et al.*, 2000). La PKC es además relevante en cuanto al mantenimiento de la función endotelial, porque su activación en el endotelio como consecuencia de la hiperglicemia reduce la biodisponibilidad de NO, promoviendo defectos en la vasodilatación y, en consecuencia, disfunción endotelial (Beckman JA., 2001).



El efecto oxidante de la hiperglicemia se ha visto también inducido de manera indirecta a través de la inhibición de la enzima antioxidante tioredoxina mediante la inducción de la expresión de su inhibidor, la proteína de interacción con tioredoxina (TXNIP), proceso que está mediado por los niveles de glucosa (Schulze PC. *et al.*, 2004).

Pero en la DM2 no solo la glucosa es la responsable del estrés oxidativo, sino que otros factores como la hiperlipemia también participan. La presencia de ácidos grasos libres en elevadas concentraciones en sangre favorecen la generación de ERO por la NADPH oxidasa (Inoguchi T. *et al.*, 2000). Además la combinación de hiperlipemia con el ambiente oxidante en los vasos sanguíneos contribuye a la formación de partículas de LDL oxidadas, que favorecen el proceso de aterosclerosis.

La regulación del equilibrio redox celular también puede verse alterado durante la DM2 por la acción de la proteína adaptadora de 66-kDa, homóloga de colágeno Src (p66shc). Esta proteína participa en el proceso de apoptosis y tiene un papel prooxidante generando  $H_2O_2$  en la mitocondria al oxidar al citocromo c. Se ha observado un incremento de la expresión de p66shc en pacientes con DM2, lo cual se correlaciona además con el aumento de estrés oxidativo, destacando el papel que juega esta proteína en la generación de ERO en el contexto de la DM2 (Giorgio M. *et al.*, 2005; Pagnin E. *et al.*, 2005).

#### 1.3.1.2.2. Estrés oxidativo en las complicaciones vasculares de la DM2

El estrés oxidativo es el principal promotor de disfunción endotelial y, por tanto, el mecanismo patológico que subyace a las complicaciones vasculares de la DM2 (Gorin Y. *et al.*, 2013). Concretamente, el radical  $O_2^{\cdot\cdot}$  reacciona con las moléculas de NO inactivándolas y, por tanto, reduciendo su biodisponibilidad, lo cual genera defectos en la vasodilatación y contribuye así a la disfunción endotelial que precede al desarrollo de problemas en el sistema cardiovascular.

Además, la ausencia de una compensación apropiada a esta producción de ERO por parte del sistema endógeno de defensas antioxidantes acentúa la situación de estrés, promoviendo la activación de rutas de señalización sensibles a los radicales libres como la inflamación, y contribuyendo finalmente al desarrollo de complicaciones vasculares (Cheng X. *et al.*, 2011). La activación de la señalización proinflamatoria como consecuencia del aumento de la producción de ERO se da fundamentalmente

por la activación de NF- $\kappa$ B, que induce la síntesis de citoquinas que promueven el estado inflamatorio característico de la DM2.

En el caso de la nefropatía diabética, por ejemplo, la actividad de la NADPH oxidasa se ha relacionado con el desarrollo de las alteraciones del glomérulo, siendo el origen del daño oxidativo que causa la hipertrofia glomerular. En paralelo a este efecto, la generación de ERO también daña las células mesangiales y los podocitos en el riñón, evidenciando el papel generalizado que juega el estrés oxidativo en la enfermedad renal diabética (Gorin Y. *et al.*, 2005).

En el contexto de las complicaciones macrovasculares como la cardiopatía diabética, el estrés oxidativo es también el denominador común. Se ha demostrado que el mecanismo que desencadena la muerte de miocitos que precede a la cardiomiopatía en la DM2 es precisamente la inducción de la apoptosis mediada por las ERO derivadas de la hiperglicemia (Cai L. *et al.*, 2002). Además las ERO promueven la disfunción cardíaca derivada de la DM2, ya que se sabe que la falta de contracción del miocardio puede ser recuperada al inhibir la actividad de la NADPH oxidasa (Roe ND. *et al.*, 2011).

#### 1.3.1.2.3. Defensas antioxidantes en la DM2

Los niveles de antioxidantes en pacientes con DM2 están disminuidos (Hernandez-Mijares A. *et al.*, 2011; Yadav D. *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* y en roedores muestran que la sobreexpresión de catalasa en las células  $\beta$  pancreáticas las protege frente al estrés oxidativo, pudiendo favorecer una correcta funcionalidad de estas células en situación de hiperglicemia (Gurgul E. *et al.*, 2004; Xu B. *et al.*, 1999). Se podría pensar que la compensación de este déficit de antioxidantes con suplementos orales podría mejorar la calidad de vida de estos pacientes y, de hecho, hay estudios que respaldan esta hipótesis (Martina V. *et al.*, 2008; Montero D. *et al.*, 2014). Un ejemplo de ello son los resultados de un ensayo clínico en pacientes diabéticos a los que se les administró N-acetilcisteína y L-arginina, dos moléculas con conocidos efectos antioxidantes. A los 6 meses de tratamiento se observó una disminución en los niveles de distintos factores de riesgo cardiovascular, como el colesterol total, las LDL y la presión arterial, así como un aumento de HDL y una mejora en el grosor de la íntima-media, todo ello indicativo de que el tratamiento con antioxidantes reduce el riesgo de ECV en pacientes con DM2 (Martina V. *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayor parte de la investigación dedicada a evaluar el posible efecto beneficioso de los antioxidantes en enfermedades cardiovasculares no ha sido muy satisfactorio. Las

vitaminas C y E han sido ampliamente utilizadas en ensayos clínicos para evaluar su potencial efecto beneficioso a nivel vascular en pacientes diabéticos, y los resultados de los ensayos más relevantes se han analizado en conjunto en un reciente metaanálisis. De esta revisión sistemática se puede deducir que, en individuos diabéticos no obesos, las vitaminas C y E ejercen un papel beneficioso, mejorando la función endotelial. Sin embargo, los efectos de estas vitaminas son neutros en pacientes con DM2 y obesidad, probablemente debido al mayor grado de RI que presenta este grupo de pacientes, así como a la mayor presencia de ácidos grasos libres en la circulación (Montero D. *et al.*, 2014).

#### 1.3.1.2.4. Disfunción mitocondrial en la DM2

La función mitocondrial en la DM2 ha sido evaluada ampliamente, tanto en modelos animales como en humanos, estableciéndose una relación directa entre la disfunción mitocondrial y la RI (Patti ME. *et al.*, 2010). De especial interés es el estudio de tejidos con un elevado consumo de O<sub>2</sub> como el músculo esquelético o el tejido cardíaco, donde la alteración de las mitocondrias puede tener consecuencias marcadamente perjudiciales en la fisiología. En ratones diabéticos (*db/db*) existe una disminución de la respiración mitocondrial en el hígado, mientras que está aumentada en el músculo esquelético, indicando que la regulación de la actividad mitocondrial es tejido-específica (Holmström MH. *et al.*, 2012). Sin embargo, en sujetos diabéticos se ha observado una disfunción mitocondrial a nivel muscular, manifestándose con una actividad reducida de la citrato sintasa, enzima que participa en el metabolismo oxidativo, así como una disminución de la actividad global de la cadena respiratoria y del consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial (Kelley DE. *et al.*, 2002; Rabøl R. *et al.*, 2009). El ejercicio aeróbico en estos pacientes es capaz de aumentar la tasa de respiración mitocondrial muscular, disminuir la producción de ERO y mejorar la sensibilidad a la insulina (Hey-Mogensen M. *et al.*, 2010). En otros tejidos como el miocárdico se ha descrito una disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial y una implicación de esta alteración en la disfunción cardíaca que se desarrolla con la obesidad (Boudina S. *et al.*, 2005).

Existe una relación entre disfunción mitocondrial y disfunción endotelial en la DM2 la cual se ha establecido gracias a la determinación de alteraciones en la función mitocondrial tanto en el endotelio como en células de sangre periférica. Pese a que las células endoteliales tienen un contenido de mitocondrias escaso, su alteración puede generar defectos en la función contráctil de los vasos sanguíneos. De hecho, se



ha observado que en arteriolas obtenidas de tejido adiposo de pacientes con DM2 hay un incremento del potencial de membrana mitocondrial en comparación con sujetos sanos, así como una mayor generación de  $O_2^{\cdot -}$  y una menor masa mitocondrial. Estas características van unidas a una disminución en la dilatación y el tono de los vasos sanguíneos en respuesta al flujo sanguíneo, signos de disfunción endotelial que subyacen a la DM2 (Kizhakekuttu TJ. *et al.*, 2012). En este sentido, el consumo de  $O_2$  mitocondrial en células mononucleares de sangre periférica se ha visto aumentado en pacientes con DM2, debido a un aumento en la generación de radicales libres que generaría una mayor respiración desacoplada. Esta tasa de respiración mitocondrial se correlaciona con una reducción en la vasodilatación inducida por nitroglicerina (Hartman, ML. *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha evaluado el consumo de  $O_2$  mitocondrial en leucocitos polimorfonucleares, siendo en este caso reducido en comparación con sujetos sanos, y viéndose además que sería consecuencia de una disfunción del complejo I mitocondrial (Hernandez-Mijares A. *et al.*, 2011). Estas discrepancias ponen de manifiesto que se requieren más estudios para la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la DM2 y manifestados por las células circulantes, dado que son de gran relevancia en enfermedades sistémicas como la DM2. Además el tratamiento de estas alteraciones podría prevenir la aceleración de los procesos ateroscleróticos que se dan en este tipo de pacientes, disminuyendo así el riesgo de ECV.

#### 1.3.1.2.5. Papel de la MPO en la generación de ERO en el sistema cardiovascular

Diferentes estudios han demostrado la presencia de moléculas de MPO en las placas de ateroma, las cuales son capaces de oxidar las LDL generando partículas de LDL oxidadas (Klebanoff SJ., 2005). Asimismo, la MPO cataliza modificaciones en las apolipoproteínas A1 (Apo A1) presentes en las HDL, alterando así su capacidad de promover el transporte reverso del colesterol (Zheng L. *et al.*, 2004; Shao B. *et al.*, 2006; Nicholls SJ. *et al.*, 2005). Además la MPO es capaz de consumir el NO endotelial, promoviendo así la disfunción endotelial (Eiserich JP. *et al.*, 2002). No solo estas cualidades la vinculan con la aparición de ECV, sino que se ha descrito que la MPO podría participar en el reclutamiento de leucocitos en las paredes endoteliales. Según Klinke y colaboradores (2011), gracias a su carga positiva, la molécula de MPO promueve el acercamiento y la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular, cuyas cargas superficiales negativas no favorecen la atracción inicial.

Diversos estudios apuntan a que niveles elevados de MPO son indicadores de un mayor riesgo de eventos cardiovasculares, siendo esta enzima un factor independiente de predicción del riesgo de infarto de miocardio (Baldus S. *et al.*, 2003; Tang WH. *et al.*, 2009), de mortalidad después de un infarto de miocardio (Mocatta TJ. *et al.*, 2007), marcador de la progresión de aterosclerosis carotídea (Exner M. *et al.*, 2006) y predictor de disfunción endotelial (Vita JA. *et al.*, 2004). Estas evidencias indican que la MPO podría estar directamente relacionada con la fisiopatología de la ECV, de hecho, recientemente se ha demostrado que la MPO derivada de los neutrófilos es capaz de provocar cambios morfológicos y una pérdida de la integridad de la membrana plasmática en células endoteliales (Pitanga TN. *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que la MPO, por su capacidad de generar ERO, ejerce un rol importante en el sistema inmunitario pero que puede estar favoreciendo alteraciones en el sistema cardiovascular, es interesante su estudio en el contexto de la DM2, tanto como marcador de la función leucocitaria como posible fuente de ERO que contribuye al estrés oxidativo y a la disfunción endotelial que conduce a las complicaciones vasculares asociadas.

### 1.3.2. Estrés de retículo endoplasmático

#### 1.3.2.1. Retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es el orgánulo intracelular responsable de la síntesis y plegamiento de proteínas, y de la adición de modificaciones postraduccionales a las nuevas proteínas. En el RE residen las chaperonas, que son las proteínas encargadas de plegar correctamente las proteínas recién sintetizadas. Además, el RE es un importante almacén de calcio.

#### 1.3.2.2. Respuesta al mal plegamiento proteico

En ciertas situaciones patológicas, las proteínas mal plegadas se acumulan en el lumen del RE, se activa entonces una cascada de señalización denominada respuesta a las proteínas mal plegadas, en inglés “unfolded protein response” (UPR). Esta respuesta está mediada a través de tres rutas de señalización encabezadas por tres proteínas transmembrana que actúan como sensores de estrés, y son PERK (quinasa de RE PKR-like), IRE1 (enzima que requiere inositol 1), y ATF6 (factor de transcripción de activación 6). La primera señal de activación de las 3 rutas es la

disociación de la chaperona GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78kDa), que está normalmente unida a los tres sensores, y se disocia de ellos cuando su función plegadora es requerida por la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. Por una parte, tras su activación, PERK fosforila eIF2 $\alpha$  (iniciador de la traducción eucariótica, subunidad  $\alpha$ ), inhibiendo de manera global el proceso de traducción con objeto de reducir la sobrecarga de proteínas en el RE. De manera específica, a través de esta misma ruta se activa ATF4 (factor de transcripción de activación 4), que promueve la expresión de genes antioxidantes y, cuando el estrés es crónico, induce el factor proapoptótico CHOP (proteína homóloga de C/EBP de unión al enhancer CCAAT). Por otra parte, la activación de IRE1 da lugar al splicing de ARN mensajero de la proteína de unión a X-box 1 (XBP1), que queda en forma cortada o sXBP1. Tras este paso se induce la expresión de chaperonas y proteínas que median la respuesta de degradación asociada al RE (ERAD). La tercera y última rama está encabezada por ATF6 que, tras su activación, se transloca al aparato de Golgi, donde es cortada y dirigida al núcleo e igual que en la ruta de IRE1, se activa la expresión de chaperonas y proteínas de la ERAD (Figura 5) (Hotamisligil GS., 2010). Con toda esta maquinaria, la respuesta adaptativa y citoprotectora inicial de la UPR intenta limitar la carga proteica en el RE atenuando la traducción, incrementando la capacidad plegadora del RE y potenciando la degradación de proteínas mal plegadas. Cuando hay una gran acumulación de proteínas mal plegadas la UPR activa mecanismos de autofagia para digerir los agregados proteicos. Sin embargo, cuando la amplitud y la duración del estrés son excesivas, las señales proapoptóticas se activan.

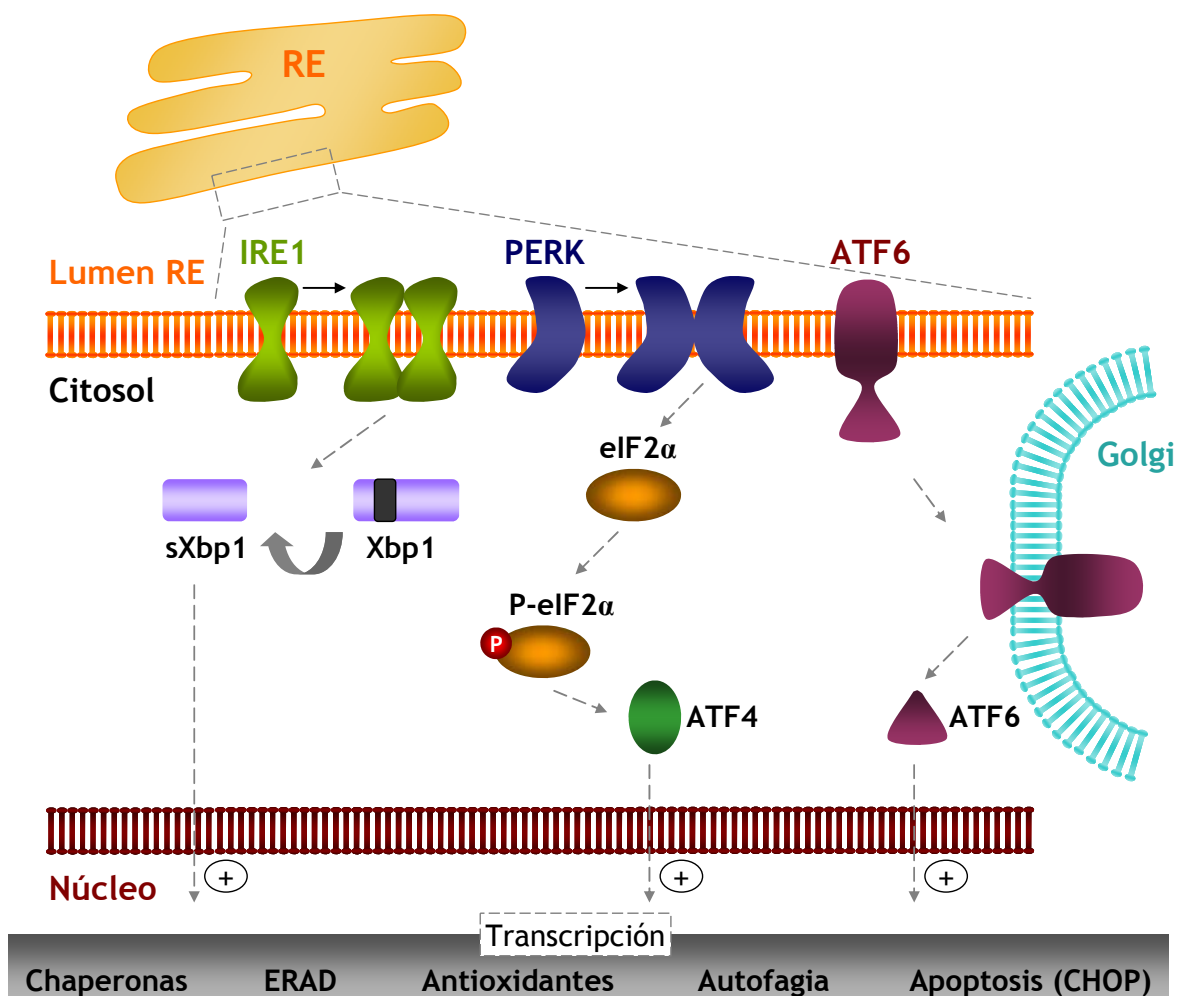


Figura 5. Respuesta al mal plegamiento proteico o UPR. Los 3 sensores de estrés en el RE: IRE1, PERK y ATF6 detectan un aumento de proteínas mal plegadas y desencadenan la respuesta con objeto de resolver la situación de estrés. IRE1 dimeriza y promueve el splicing del ARNm de Xbp1 formándose sXbp1 que se transloca al núcleo. PERK también pasa a formar dímeros y activa la fosforilación de eIF2α, se induce entonces la síntesis de ATF4 que se dirige al núcleo. ATF6 es procesado en el aparato de Golgi y su versión corta pasa al núcleo. En conjunto estas tres proteínas que se translocan al núcleo inducen la transcripción de genes relacionados con el plegamiento de proteínas, la ruta ERAD, la respuesta antioxidante, la autofagia y la apoptosis. RE, retículo endoplasmático; IRE1, proteína que requiere inositol; PERK, quinasa de retículo endoplasmático PKR-like; ATF6, factor activador de la transcripción 6; Xbp1, proteína de unión a X-box 1, eIF2α, iniciador de la traducción eucariótica, subunidad α; ATF4, factor activador de la transcripción 4; ERAD, respuesta de degradación asociada al retículo endoplasmático; CHOP, proteína homóloga de C/EBP de unión al enhancer CCAAT.

### 1.3.2.3. Estrés de RE en la DM2

Se sabe que el estrés de RE es un mecanismo central en la obesidad y la DM2. El primer estudio que evidenció que el estrés de RE contribuye al desarrollo de RI en los tejidos diana fue el realizado por Ozcan y colaboradores y publicado en la revista *Science* en 2004. Determinaron en ratones que existe estrés de RE en condiciones de obesidad, tanto inducida por una ingesta de grasas como genéticamente. Particularmente, observaron una activación pronunciada de la UPR en el hígado y el tejido adiposo de estos ratones, pero no en el músculo. Además determinaron que el estrés de RE bloquea la acción de la insulina por la activación de JNK, que promueve la fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS-1, inhibiendo así la cascada de señalización por insulina (Ozcan U. *et al.*, 2004). A raíz de este trabajo numerosos estudios han profundizado en el papel del estrés de RE en la fisiopatología de la DM2, su interacción con otras rutas de señalización como la inflamatoria, así como la posible implicación de este tipo de estrés en las alteraciones micro y macrovasculares que acompañan a la enfermedad.

Las conexiones del estrés de RE con los mecanismos fisiopatológicos de la DM2 son numerosas. En relación con el principal proceso alterado en la DM2 que es la homeostasis de la glucosa, ATF4 parece participar en el control del metabolismo de carbohidratos, siendo esencial su función para mantener un equilibrio energético adecuado. Sin embargo, esta proteína está altamente expresada bajo condiciones de estrés de RE, lo cual podría alterar este mecanismo de control (Seo J. *et al.*, 2009).

Se ha demostrado en numerosos estudios que una de las características que presenta el tejido adiposo de individuos obesos es el estrés de RE (Boden G. *et al.*, 2008; Kawasaki N. *et al.*, 2012). Aunque no solo los adipocitos presentan una activación pronunciada de la UPR, ya que las células hepáticas se comportan de manera similar. No obstante, la pérdida de peso en estos sujetos es capaz de reducir la expresión de proteínas de la UPR tanto en tejido adiposo como en hígado, evidenciando que el estrés de RE es un mecanismo central derivado de la obesidad (Gregor MF. *et al.*, 2009). La activación de la UPR en el hígado podría estar contribuyendo al desarrollo de RI de diversas formas. Una de ellas es aumentando la gluconeogénesis, ya que se ha observado que cuando existe estrés de RE aumenta la glucosa 6-fosfato en las células hepáticas (Wang D. *et al.*, 2006). Otra forma sería promoviendo la lipogénesis hepática característica de los pacientes con RI, a través de XBP1 que es capaz de

regular la síntesis de ácidos grasos, con lo cual sus niveles elevados pueden contribuir a una mayor lipogénesis (Lee AH. *et al.*, 2008).

El mecanismo mediante el cual la obesidad induce un incremento en la actividad de la UPR no se conoce, aunque se ha apuntado en un estudio realizado en ratones, a que posiblemente previo al comienzo del estrés de RE, el proteasoma deje de funcionar correctamente y, por tanto, no sea capaz de eliminar proteínas defectuosas en la célula, promoviendo así la activación de la señalización UPR (Otda T. *et al.*, 2013). Recientemente además, se ha corroborado este papel crucial de la funcionalidad del proteasoma en muestras de adipocitos humanos. Se ha observado que en estos adipocitos existe una disfunción del proteasoma como consecuencia del estrés oxidativo que acompaña a la obesidad, y este bloqueo de la función del proteasoma acentúa el estrés de RE, pudiendo contribuir así al desarrollo de la RI (Díaz-Ruiz A. *et al.*, 2015). Otro posible inductor del estrés de RE podría ser la propia insulina. En este sentido se ha demostrado que la hiperinsulinemia deriva en un aumento de estrés de RE en el tejido graso, observándose que GRP78, ATF4, ATF6 y XBP1 aumentan en respuesta a la administración de dosis elevadas de insulina en sujetos normoglicémicos (Boden G. *et al.*, 2014). Y, aunque en este estudio se advierte que la insulina podría ser la principal molécula desencadenante de estrés de RE, esto no podría ser aplicado en el contexto de la DM2, dado que los tejidos diana de la insulina son incapaces de responder a esta hormona. Por tanto, otros mecanismos deben de subyacer a la activación de la UPR en la DM2.

#### 1.3.2.4. Relación del estrés de RE y la inflamación

Cabe destacar que el estrés de RE está muy relacionado con la inflamación, por tanto esta interacción podría tener un papel determinante en el desarrollo de la DM2. Numerosos estudios establecen que la señalización inflamatoria y la UPR convergen en diversos puntos. Se sabe que IRE1 es capaz de activar la señalización por JNK a través del reclutamiento de la molécula adaptadora TRAF2 (factor 2 asociado al receptor TNF). Y no solo esta ruta de la UPR converge con la señalización inflamatoria, sino que las tres vías pueden dar lugar a la activación de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, la UPR es capaz de interactuar con uno de los complejos que forman el inflamasoma, NLRP3, que está formado por esta proteína sensora y la caspasa 1, y se encarga de procesar algunas citoquinas como la interleuquina 1 beta (IL1 $\beta$ ) e inducir su liberación. En concreto, la activación de IRE1 promueve un aumento en los niveles de TXNIP, la cual activa el inflamasoma NLRP3, siendo este proceso otro de los

enlaces directos entre el estrés de RE y la inflamación (Lerner AG. *et al.*, 2012). La activación de la señalización inflamatoria por la UPR puede mediar respuestas metabólicas e inmunitarias relacionadas con el desarrollo de RI (Hotamisligil GS., 2010). A favor de esta hipótesis, se ha observado que en el tejido adiposo de ratones obesos hay una activación de la inflamación de forma crónica como consecuencia de un aumento del estrés de RE (Kawasaki N. *et al.*, 2012). Este mecanismo podría estar contribuyendo al desarrollo de RI no solo de forma local en los adipocitos, sino a nivel sistémico por la liberación de citoquinas desde el tejido adiposo a la circulación como consecuencia, al menos en parte, de la activación de la UPR.

#### 1.3.2.5. Relación entre el estrés oxidativo y el estrés de RE

No menos importante es la relación entre el estrés oxidativo y el estrés de RE. El lumen del RE representa el ambiente oxidante necesario para el correcto plegamiento de proteínas a través de los puentes disulfuro formados por la enzima disulfuro isomerasa (Higa A. *et al.*, 2012). Como consecuencia, cualquier perturbación en la homeostasis redox o la excesiva producción de ERO, puede afectar la capacidad plegadora del RE, dando lugar a estrés de RE (Görlach A. *et al.*, 2006). No obstante, esta relación entre estrés oxidativo y de RE, no es unidireccional, dado que un excesivo estrés de RE da lugar a un incremento de la producción de ERO, dando lugar finalmente a la muerte celular (Haynes CM. *et al.*, 2004). Además, entre las funciones reparadoras de la UPR se encuentra la síntesis de antioxidantes, la cual se estimula a través de la vía de señalización de PERK que promueve la transcripción de genes antioxidantes. De este modo se activa Nrf2, regulador de múltiples enzimas antioxidantes y mediador de la adaptación celular a estrés oxidativo (Cullinan SB. *et al.*, 2003). Por tanto, la UPR y el control del equilibrio redox celular forman una respuesta conjunta de adaptación a una situación de estrés, que se da en múltiples patologías como la DM2.

#### 1.3.2.6. Estrés de RE y desarrollo de complicaciones vasculares

El papel del estrés de RE en las complicaciones vasculares de la DM2 ha sido ampliamente evaluado. Un incremento de la señalización derivada del estrés de RE se ha relacionado con la aparición de complicaciones microvasculares en la DM2. Así por ejemplo, se ha observado en ratones a los que se les induce un estado diabético, que la nefropatía que desarrollan puede ser prevenida en ausencia de CHOP, resaltando el papel clave de esta proteína característica de estrés de RE crónico en

el desarrollo de la nefropatía diabética (Wu J. *et al.*, 2010). También la presencia de estrés de RE se ha observado *in vitro* en células endoteliales de la retina sometidas a elevadas concentraciones de glucosa, así como *in vivo* en la retina de ratas con DM2. Este estado de estrés en la retina provoca un aumento de la muerte celular que da lugar finalmente al desarrollo de retinopatía diabética (Li B. *et al.*, 2009).

También el estrés de RE podría participar en la patogénesis subyacente a las complicaciones macrovasculares. Por ejemplo, en la cardiopatía diabética, donde parece ser que la activación crónica de la UPR en los cardiomiocitos desencadenaría la muerte de estas células y contribuiría a la hipertrofia cardíaca y, finalmente, al fallo cardíaco. El mecanismo mediante el cual el estrés de RE daría lugar a la apoptosis de los cardiomiocitos es la alteración drástica de la homeostasis del calcio (Okada K. *et al.*, 2004; Yang L. *et al.*, 2015). También las células endoteliales son susceptibles al estrés de RE, que a nivel vascular puede estar inducido por diversos estímulos, como la hiperlipidemia, particularmente por las partículas de LDL oxidadas, o bien por la hiperglicemia (Sanson M. *et al.*, 2009; Mooradian AD. *et al.*, 2011). Se ha observado que hay una activación de las tres rutas de señalización de la UPR en regiones del endotelio susceptibles a la formación de placas ateroscleróticas, indicando que la activación de la UPR en el endotelio vascular podría ser un mecanismo precedente a la aterosclerosis (Civelek M. *et al.*, 2009). Y no solo se activaría la UPR en el células endoteliales, sino que también se ha observado en monocitos aislados de pacientes con enfermedad coronaria un incremento del estrés de RE, lo cual podría favorecer la infiltración de estas células en las regiones susceptibles de aterosclerosis (Mozzini C. *et al.*, 2014). De hecho, al analizar a nivel molecular las placas ateroscleróticas de pacientes con enfermedad coronaria, se ha observado la presencia de estrés de RE tanto en las células del músculo liso como en los macrófagos infiltrados (Myoishi M. *et al.*, 2007). El tratamiento con chaperonas se ha visto que atenuaría el estrés de RE en los macrófagos evitando así el proceso aterosclerótico (Erbay E. *et al.*, 2009). Todas estas evidencias ponen de manifiesto el papel clave que la UPR podría tener en el desarrollo de aterosclerosis en la DM2, concretamente al activarse esta respuesta al estrés de RE en células circulantes. Sin embargo, no se ha evaluado si esta inducción de la UPR podría incrementar la interacción de estas células con el endotelio, lo cual explicaría al menos en parte, el riesgo aumentado de estos pacientes de padecer problemas cardiovasculares.



### 1.3.3. Autofagia

La autofagia es el proceso de degradación de componentes celulares en vesículas membranosas conocidas como autofagosomas para el reciclaje de sus componentes esenciales, como es el caso de las proteínas de las que se reciclan los aminoácidos. También mediante autofagia se eliminan orgánulos enteros que están dañados. Por tanto, la autofagia es esencial para la supervivencia celular y el mantenimiento las funciones celulares, sin embargo cuando el proceso de autofagia se activa de forma excesiva puede dar lugar a la muerte celular (Mizushima N., 2007). La autofagia participa en la regulación de numerosos procesos como la prevención de la degeneración neuronal, la supresión de tumores, la inmunidad o la muerte celular programada. De hecho, el proceso mediante el cual las células se digieren a sí mismas y mueren se denomina muerte celular programada tipo 2, para diferenciarla de la tipo 1 que es la apoptosis (Yang Z. *et al.*, 2010).

#### 1.3.3.1. Mecanismo de acción

Uno de los estímulos más comunes que desencadenan la activación de la autofagia es la privación de nutrientes. Entonces se inicia el proceso de autofagia con la expansión de una porción de doble membrana llamada fagóforo, que fagocita componentes citosólicos y que, al cerrarse, forma las vesículas membranosas denominadas autofagosomas. Éstas se fusionan con lisosomas que les aportan las enzimas necesarias para la degradación del material citoplasmático, liberándose finalmente las macromoléculas resultantes de esta digestión al citosol (Xie Z. *et al.*, 2007). A nivel molecular, las proteínas de la familia Atg, que fueron descubiertas por primera vez en levaduras, son las principales reguladoras de la autofagia. Es por ello que son ampliamente empleadas para detectar la activación de la autofagia en eucariotas y organismos superiores. Una de las proteínas más utilizadas es la cadena ligera 3 asociada al microtúbulo (LC3), ortóloga de Atg8 en levaduras. Esta proteína se puede presentar en su forma citosólica, LC3-I, o bien en la forma modificada por lipidación, que está unida al autofagosoma, LC3-II. En concreto la detección de ésta última forma es la que indica la presencia de autofagia, además de la localización de las vesículas autofágicas cuando es estudiada por microscopía (Tanida I. *et al.*, 2005). Otra de las proteínas que participan en el proceso de autofagia es la Beclina 1, ortóloga de Atg6, que media el reclutamiento de diversas proteínas necesarias para la autofagia hacia la membrana del preautofagosoma, contribuyendo así a la formación del autofagosoma (Kihara A. *et al.*, 2001) (Figura 6). Uno de los

reguladores más importantes de la autofagia es la quinasa mTOR, que regula negativamente la autofagia cuando es inducida por los niveles altos de insulina tras la ingesta de nutrientes. Lo opuesto ocurre en ausencia de nutrientes, mTOR es inhibida y se activa la autofagia (Mizushima N., 2007).

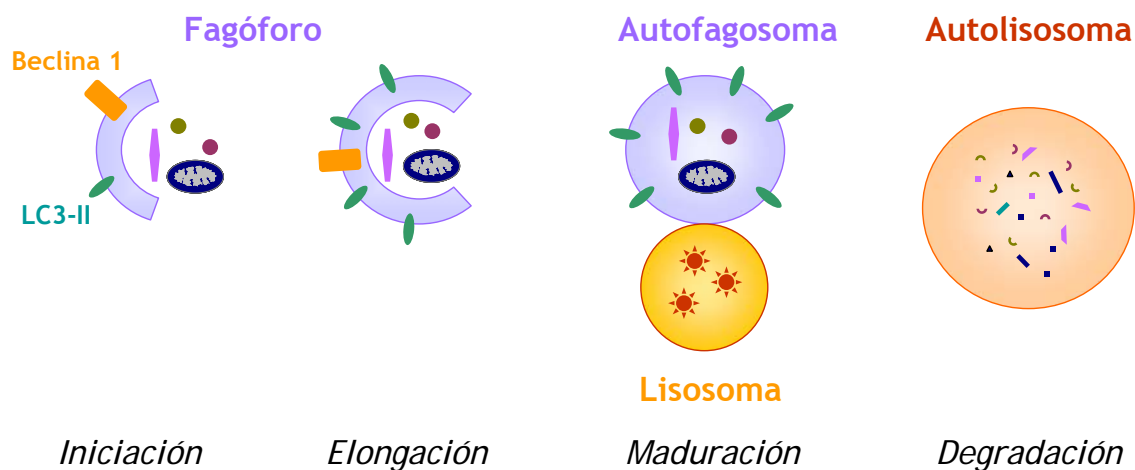


Figura 6. Fases del proceso de autofagia. La autofagia se inicia tras el estímulo desencadenante que puede ser por ejemplo, la privación de nutrientes. A la membrana que envuelve los componentes a degradar se la denomina inicialmente fagóforo, y a ésta se unen proteínas como Beclina 1 o LC3-II, requeridas para la formación del autofagosoma, el cual es completado al cerrarse la vesícula membranosa. Se denomina a esta vesícula autofagosoma y contiene los orgánulos y componentes citosólicos a degradar. Posteriormente se fusiona con el lisosoma que posee las enzimas necesarias para el último paso del proceso, la degradación. En este último estadio, la vesícula se denomina autolisosoma.

### 1.3.3.2. Autofagia en el contexto de enfermedad

Diversas enfermedades se han visto relacionadas con defectos en la autofagia. Un ejemplo sería lo que ocurre en el cáncer, donde la autofagia parece estar actuando como un mecanismo citoprotector en las células tumorales, aumentando su supervivencia. Prueba de ello es que la inhibición de la autofagia aumenta la citotoxicidad inducida por el tratamiento con quimioterapia, facilitando la regresión tumoral (Amaravadi RK. *et al.*, 2007). También la autofagia es clave en el sistema inmunitario, puesto que participa como mecanismo defensivo frente a ciertos microorganismos, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Streptococcus pyogenes* (Yang Z. *et al.*, 2010). Esto hace que defectos en la maquinaria que media la autofagia predispongan a un mayor riesgo frente a infecciones. En este contexto, se ha

observado que diversos genes implicados en la replicación de *Mycobacterium tuberculosis* en el huésped son, de hecho, reguladores de la autofagia (Kumar D. *et al.*, 2010).

#### 1.3.3.3. Autofagia en la DM2

Un gran número de estudios respaldan que la autofagia juega un papel importante en la fisiopatología de la DM2. En concreto, la activación correcta de la autofagia es clave para la función secretora de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas, así como en el mantenimiento de su homeostasis y la estructura de los islotes pancreáticos, particularmente en condiciones de exceso de nutrientes, como es el caso de la DM2 (Ebato C. *et al.*, 2008). La importancia de la autofagia en las células  $\beta$  pancreáticas ha sido demostrada en numerosos estudios. Jung y colaboradores lo evidenciaron en un estudio en el que se emplearon ratones cuyas células  $\beta$  pancreáticas eran deficientes en la proteína Atg7, la cual es esencial para la formación de autofagosomas. Se observó que estos ratones presentaban hiperglicemia, intolerancia a la glucosa e hipoinsulinemia, debido a que sus células  $\beta$  eran incapaces de secretar insulina en respuesta a glucosa. Además estos ratones tenían menor masa de células  $\beta$ , dado que sufrían una mayor muerte celular y una menor proliferación (Jung HS. *et al.*, 2008). Se ha demostrado también que la autofagia es la responsable de la eliminación de agregados proteicos en las células  $\beta$ , los cuales son consecuencia del estrés oxidativo derivado de la hiperglicemia, por tanto actuaría como un mecanismo protector frente a los efectos nocivos de la DM2 (Kaniuk NA. *et al.*, 2007). Por todo lo anteriormente comentado, es evidente la importancia de la autofagia en la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas.

En otros tejidos como el hígado se ha observado que la hiperinsulinemia y la RI inducen una disminución de la expresión de genes relacionados con la autofagia (Liu HY. *et al.*, 2009). Los ratones con obesidad, ya sea inducida por una dieta rica en grasas o genéticamente (genotipo *ob/ob*), presentan una disminución de la autofagia en el hígado, mostrando niveles reducidos de LC3, Beclina 1, Atg5 y Atg7 (Yang L. *et al.*, 2010). Esta desregulación de la autofagia en las células hepáticas por la obesidad podría estar contribuyendo al desarrollo de RI. Sin embargo, no ocurre lo mismo en los adipocitos de pacientes obesos y diabéticos, donde se ha observado que la autofagia está hiperactivada y además se correlaciona positivamente con la RI y la inflamación (Ost A. *et al.*, 2010; Jansen HJ. *et al.*, 2012). La autofagia contribuiría por tanto al desarrollo de estos mecanismos básicos que subyacen a la DM2. A favor

de esta hipótesis se ha descrito que al inhibir la autofagia en adipocitos de ratón, los animales pierden peso, se incrementa su sensibilidad a la insulina y además disminuye la inflamación en el tejido adiposo (Zhang Y. *et al.*, 2009). Las diferencias en cuanto a la inhibición o activación de la autofagia en hígado y tejido adiposo, respectivamente, en modelos murinos así como en pacientes diabéticos indican que la regulación de la autofagia en el contexto de la obesidad y la DM2 varía en función del tipo celular. Cabe destacar que la autofagia tampoco parece ser un mecanismo alterado a consecuencia de la DM2 de manera generalizada en los tejidos diana de la insulina, dado que recientemente se ha evaluado la expresión de diversos genes relacionados con la autofagia en músculo de pacientes diabéticos y no se han observado diferencias respecto a los niveles de expresión en músculo de sujetos normoglicémicos (Kruse R. *et al.*, 2015).

#### 1.3.3.4. Relación de la autofagia y el estrés celular

Entre los procesos intracelulares subyacentes a la DM2 que podrían regular la activación de la autofagia se encuentra la excesiva producción de radicales libres y el estrés de RE (Kiffin R. *et al.*, 2006; Gonzalez CD. *et al.*, 2011).

Por un lado, elevadas cantidades de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot -}$  han sido relacionadas con la inducción de autofagia (Scherz-Shouval R. *et al.*, 2007; Chen Y. *et al.*, 2009). También se ha descrito en células de músculo esquelético que la privación de nutrientes genera un incremento de las ERO mitocondriales, y éstas son las responsables de activar el proceso de autofagia (Rahman M. *et al.*, 2014). Se puede deducir de éstos y otros estudios que, al producirse daños en componentes celulares como consecuencia de una situación de estrés oxidativo, la célula activa los mecanismos de autofagia para eliminar los orgánulos dañados. En el caso de que dichos orgánulos sean mitocondrias, el proceso de fagocitosis por parte de los autofagosomas para combatir el estrés celular se denomina mitofagia, y representa un mecanismo central de control de calidad de las mitocondrias (Youle RJ. *et al.*, 2011). Dado que en la DM2 la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son mecanismos centrales de la fisiopatología de la enfermedad, el estudio de la posible activación de la autofagia en respuesta a estos procesos ayudaría a conocer en profundidad cómo se adaptan y responden las células al daño oxidativo, pudiendo desvelar así estrategias terapéuticas para combatirlo.

Por otro lado, la activación de la autofagia también puede darse por parte de la UPR y asimismo desempeña un papel protector, eliminando agregados proteicos perjudiciales y aumentando así la supervivencia celular. Esta respuesta de “limpieza”

por parte de la autofagia es clave, por ejemplo, en el mantenimiento de la función de las células  $\beta$  pancreáticas cuando sufren estrés de RE por la excesiva demanda de insulina (Ogata M. *et al.*, 2006; Bartolome A. *et al.*, 2012). La relación entre autofagia y estrés de RE en el contexto de la DM2 es bidireccional, ya que se ha observado también que alteraciones en la maquinaria autofágica promueven la sobreexpresión de proteínas de la UPR (Yang L. *et al.*, 2010; Quan W. *et al.*, 2012). Por lo tanto, es importante desvelar qué relación existe entre el mecanismo de autofagia y la activación de la UPR, así como si son procesos primordiales o secundarios en el contexto de la RI y la DM2, para establecer una imagen completa de la fisiopatología de esta enfermedad que facilitaría la identificación de dianas terapéuticas.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





En la DM2 es sabido que existe un alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Las complicaciones vasculares están promovidas principalmente por la hiperglicemia y la dislipidemia subyacentes a la enfermedad, que generan un estado inflamatorio crónico alterando la fisiología del endotelio vascular. En este contexto, los leucocitos participan en la alteración de la homeostasis vascular al ser atraídos por las paredes endoteliales, favoreciendo el proceso aterosclerótico. Sin embargo, no se conoce con precisión qué mecanismos participan en la inducción de estas interacciones entre los leucocitos y el endotelio. Debido a que los leucocitos participan en la defensa inmunitaria, son capaces de generar altas cantidades de radicales libres. Por todo ello, en la presente tesis doctoral nos planteamos evaluar la posible influencia que podría tener esta producción de radicales libres en los leucocitos, así como otros mecanismos intracelulares como la disfunción mitocondrial, el estrés de RE o la autofagia en el desarrollo de la DM2. Estas alteraciones intracelulares en los leucocitos podrían estar vinculadas a la aparición de complicaciones micro- y/o macrovasculares en la DM2. De especial relevancia en cuanto a las complicaciones microvasculares es el estudio de la nefropatía diabética, cuya prevalencia es mayor que la de otras complicaciones microvasculares (39,6 % de los pacientes diabéticos) y además sus consecuencias a largo plazo pueden ser fatales, pudiendo desarrollar enfermedad renal crónica y desencadenar un fallo renal. En cuanto a las complicaciones macrovasculares de la DM2, dado que el fallo cardíaco es una de las manifestaciones más comunes y devastadoras, es interesante la investigación en la fisiopatología precedente a este fatal desenlace para el desarrollo de estrategias preventivas, como es el caso de la cardiopatía isquémica silente.

Por lo tanto, en esta tesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar el papel de la disfunción mitocondrial en la activación de los leucocitos en la DM2, así como su relación con el incremento de interacciones leucocito-endotelio y la correlación de estos factores con el desarrollo de CIS.
2. Estudiar el papel de la MPO en la generación de ERO en la DM2 y evaluar la posible asociación de la MPO con las interacciones leucocito-endotelio y el desarrollo de nefropatía diabética.

3. Evaluar en pacientes diabéticos con distinto grado de control glicémico la inducción de estrés oxidativo y estrés de RE y el papel de este último en la inducción de interacciones leucocito-endotelio.
4. Determinar si el proceso de autofagia está alterado en leucocitos de pacientes con DM2, así como su posible relación con el estrés oxidativo y el estrés de RE.

### 3. PUBLICACIONES



# Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions and Mitochondrial Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients and Their Association With Silent Myocardial Ischemia

ANTONIO HERNANDEZ-MIJARES, MD,  
PHD<sup>1,2,3,4</sup>

MILAGROS ROCHA, PHD<sup>1,3,4</sup>

SUSANA ROVIRA-LLOPIS, PHD<sup>1,3,4</sup>

CELIA BAÑULS, PHD<sup>1,3,4</sup>

LORENA BELLOD, PHD<sup>1,3,4</sup>

CARMEN DE PABLO, PHD<sup>5</sup>

ANGELES ALVAREZ, PHD<sup>5,6</sup>

ILDEFONSO ROLDAN-TORRES, MD<sup>7</sup>

EVA SOLA-IZQUIERDO, MD, PHD<sup>1</sup>

VICTOR M. VICTOR, PHD<sup>1,3,4,5,8</sup>

**OBJECTIVE**—Diabetes is associated with oxidative stress and increased mortality, but a possible correlation between leukocyte-endothelium interactions, oxidative stress, and silent myocardial ischemia (SMI) is yet to be confirmed.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS**—Mitochondrial dysfunction and interactions between leukocytes and human umbilical vein endothelial cells were evaluated in 200 type 2 diabetic patients (25 with SMI) and 60 body composition- and age-matched control subjects. A possible correlation between these parameters and the onset of SMI was explored, and anthropometric and metabolic parameters were also analyzed.

**RESULTS**—Waist, levels of triglycerides, proinflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$ ), HbA<sub>1c</sub>, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), glucose, and insulin, and homeostasis model assessment of insulin resistance were higher in diabetic patients than in control subjects. However, no statistical differences in hs-CRP and insulin levels were detected when the data were adjusted for waist. None of these parameters varied between SMI and non-SMI patients. Mitochondrial function was impaired and leukocyte-endothelium interactions were more frequent among diabetic patients, which was evident in the lower mitochondrial O<sub>2</sub> consumption, membrane potential, polymorphonuclear cell rolling velocity, and GSH/GSSG ratio, and in the higher mitochondrial reactive oxygen species production and rolling flux, adhesion, and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin molecules observed in these subjects. Moreover, these differences correlated with SMI. Statistical differences were maintained after adjusting the data for BMI and waist, with the exception of VCAM-1 levels when adjusted for waist.

**CONCLUSIONS**—Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and endothelium-inducing leukocyte-endothelium interactions are features of type 2 diabetes and correlate with SMI.

*Diabetes Care* 36:1695–1702, 2013

From the <sup>1</sup>Service of Endocrinology, University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain; the <sup>2</sup>Department of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; the <sup>3</sup>Foundation for the Promotion of Healthcare and Biomedical Research in the Valencian Community (FISABIO), Valencia, Spain; the <sup>4</sup>INCLIVA Foundation, Valencia, Spain; the <sup>5</sup>Department of Pharmacology and CIBER CB06/04/0071 Research Group, CIBER Hepatic and Digestive Diseases, University of Valencia, Valencia, Spain; the <sup>6</sup>General Foundation of the University of Valencia, Valencia, Spain; the <sup>7</sup>Cardiology Service, University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain; and the <sup>8</sup>Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

Corresponding authors: Antonio Hernandez-Mijares, hernandez\_antmij@gva.es, and Victor M. Victor, victor.victor@uv.es.

Received 25 June 2012 and accepted 1 December 2012.

DOI: 10.2337/dc12-1224

This article contains Supplementary Data online at <http://care.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/dc12-1224/-/DC1>.

A.H.-M. and M.R. contributed equally to this study.

© 2013 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

A diagnosis of diabetes worsens the prognosis of cardiovascular diseases (CVDs) to the extent that postinfarction mortality among these patients is double that of nondiabetic patients. In this sense, coronary artery disease is the major cause of morbidity and mortality in patients with diabetes, in which circumstances the prognosis is unfavorable (1), and silent myocardial ischemia (SMI) is thought to be a predictor of subclinical CVD (2).

Evidence points to the involvement of impaired mitochondrial energetics in cardiac dysfunction in obesity and diabetes (3,4). Multiple abnormalities associated with diabetes, such as hyperglycemia, hyperlipidemia, and insulin resistance, are thought to contribute to adverse outcomes in diabetes after myocardial ischemia (5).

The pathogenesis of mitochondrial dysfunction in obesity or diabetes-related heart disease is multifactorial and includes oxidative damage (4,6). In experimental models of obesity and diabetes, insulin resistance is commonly detected in tissues such as those in the heart (7).

Oxidative stress is implicated in the etiology of the insulin resistance associated with type 2 diabetes (8). Numerous studies of nonspecific antioxidant treatments provide indirect evidence of a link between oxidative stress and insulin resistance (9). Mitochondria are the main source of reactive oxygen species (ROS), which are important markers of mitochondrial function (10). Several studies have shown that the rate of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission is significantly greater when basal respiration is supported by fatty acids (11), raising the possibility that mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission is a primary factor in the etiology of insulin resistance.

Peripheral polymorphonuclear leukocytes (PMNs) are one of the main inflammatory cell types. Once activated, PMNs release ROS, which contributes to oxidative stress and the inflammation and

**Diabetes and endothelial mitochondrial dysfunction**

endothelial damage that follow. Oxidative stress occurs in the PMNs of insulin-resistant patients and is related to an impairment of mitochondrial function (8,12).

The onset of many CVDs is heralded by the movement and accumulation of leukocytes in the vessel wall. These processes are mediated by an interaction between the adhesion molecules expressed on white blood and/or endothelial cells. Different cellular adhesion molecules have been implicated in atherogenesis, including vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and selectins (13).

The current study was performed to throw light on the relationship between mitochondrial dysfunction, leukocyte activation, and the increase of leukocyte-endothelium interactions observed in type 2 diabetes and to explore a possible correlation between these factors and different clinical features, including SMI. We detected an increase in ROS production and PMN rolling flux, adhesion, and adhesion molecules, and a decrease in GSH levels, GSH/GSSG ratio, mitochondrial mass, membrane potential, and PMN rolling velocity, all of which are signs of an impairment of mitochondrial function and enhanced leukocyte-endothelium interaction. Our results endorse the hypothesis of an association between type 2 diabetes, mitochondrial dysfunction, and leukocyte-endothelium interaction. Additionally, they point to a correlation between these parameters and SMI, in the presence of which they were more affected.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS****Subjects**

Our study population consisted of 200 patients (25 with SMI,  $56.1 \pm 2.0$  years of age; those without SMI,  $55.3 \pm 1.7$  years of age) consecutively attending the Department of Endocrinology's outpatient clinic of the University Hospital Dr. Peset and who were diagnosed with type 2 diabetes according to the criteria of the American Diabetes Association. Diagnosis was confirmed when a patient fulfilled one or more of the following criteria: 1) levels of fasting serum glucose  $\geq 7.0$  mmol/L (126 mg/dL) or random serum glucose  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL) on at least two occasions; 2)  $HbA_{1c} \geq 6.5\%$ ; or 3) antidiabetic medication. Patients taking allopurinol or any oral antioxidant

supplements were excluded from the study.

Sixty volunteer control subjects ( $54.2 \pm 1.8$  years of age) were enrolled in the study and in any case they did not have the following criteria: 1) levels of fasting serum glucose  $\geq 7.0$  mmol/L (126 mg/dL) or random serum glucose  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL) on at least two occasions; 2)  $HbA_{1c} \geq 6.5\%$ ; or 3) antidiabetic medication. An additional inclusion criterion was the absence of any documented history of vascular disease (ischemic cardiopathy, peripheral arteriopathy, or cerebrovascular accident) and diabetes. Exclusion criteria were physical disability or alterations in the electrocardiogram (ECG) that made it impossible to perform an exercise stress test, or clinical signs of coronary artery, peripheral, or cerebrovascular disease. In accordance with the Declaration of Helsinki, all participants were informed of the purpose, risks, procedures, and possible benefits of the study and gave their expressed consent to take part. Approval was obtained from the hospital's ethics committee.

**Study procedure**

During their first visit, subjects provided their case history and underwent a physical examination that included measurement of BMI and waist circumference. Subjects were given an appointment at the Department of Endocrinology's functional testing unit for collection of blood for biochemical determinations. The appointment took place between 8:00 and 10:00 A.M. and patients were instructed to have fasted for at least 10 h. During the appointment, subjects were fitted with a Holter in order to monitor blood pressure over 24 h.

**Evaluation of SMI**

During the basal visit, a baseline ECG was performed and patients were monitored over the following 30 days. If a Q wave of previous myocardial necrosis was detected (i.e.,  $<0.04$  s with a depth greater than one-third the height of the QRS waves of the ECG in at least two anatomically consecutive leads), a Doppler echocardiography was performed. If this test also showed segmentary contractibility disorders, the subject was classified as positive for SMI. Otherwise, the subsequent step was 24-h Holter monitoring of the ECG, with any decrease in the ST segment  $\geq 1$  mV or any increase  $\geq 1.5$  mV and continuing for at least 1 min considered a positive result, even in the absence of symptoms of

angina. If the result was negative, the patient was submitted to an exercise stress test consisting of the Bruce protocol and according to the recommendations of the American College of Cardiology (ACC) and American Heart Association (AHA) (14). When the result of this test was negative, SMI was ruled out. If inconclusive, a nuclear stress test was performed using the criteria for positivity established by the ACC, AHA, and American Society of Nuclear Cardiology (15). If the result of the Bruce protocol or nuclear stress was positive, the patient was offered a coronary angiograph in order to confirm the diagnosis.

**Biochemical determinations**

Blood samples were collected and centrifuged at 23,000g for 15 min at 4°C. Aliquots of serum were obtained to determine total cholesterol, glucose, and triglyceride (TG) levels using an enzymatic method and HDL levels using a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., Brea, CA). The intraseries coefficient of variation (CV) was  $<3.5\%$  for all these determinations. LDL content was calculated with the Friedewald formula. Insulin and lipoprotein(a) levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (intratest CV  $<4\%$ ). Insulin resistance in patients not taking insulin was calculated using homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels were quantified by a latex-enhanced immunonephelometric assay (intra-assay CV of 8.7%).

**Cells**

PMNs were isolated from citrated blood samples and incubated with dextran (3%) for 45 min. The supernatant was obtained from the Ficoll-Hypaque gradient and centrifuged at 250g for 25 min, and the pellet was resuspended in lysis buffer after centrifugation at room temperature (100g, 5 min). PMNs were counted, washed in Hanks' balanced salt solution, and resuspended in complete RPMI medium.

**Human umbilical vein endothelial cell culture**

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were harvested from umbilical cords by means of collagenase treatment (16). Passage 1 from primary cultures was used in subsequent experiments. For adhesion studies, HUVECs were cultured on fibronectin (5 mg/mL)-coated, 25-mm plastic coverslips until confluent ( $\sim 48$  h).

### Measurements of O<sub>2</sub> consumption, membrane potential, and mitochondrial mass

PMNs were resuspended ( $5 \times 10^6$  cells/mL) in Hanks' balanced salt solution and placed in a gas-tight chamber. O<sub>2</sub> consumption was then measured with a Clark-type O<sub>2</sub> electrode (Rank Brothers, Bottisham, U.K.) (12). Sodium cyanide ( $10^{-3}$  mol/L) was used to confirm whether or not O<sub>2</sub> consumption was mainly mitochondrial (95–99%). Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM;  $5 \times 10^{-6}$  mol/L) fluorescent dye was used to assess  $\Delta\Psi_m$ . Mitochondrial mass was measured in cells treated with the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange (NAO;  $5 \times 10^{-6}$  mol/L), which specifically binds to cardiolipin independently of  $\Delta\Psi_m$  (17).

### Measurement of ROS production

Three different methods were used to measure ROS. Total ROS production was evaluated by fluorimetry using a Fluoroskan plate reader (Thermo Labsystems, Thermo Scientific, Rockford, IL) after a 30-min incubation with the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA;  $5 \times 10^{-6}$  mol/L), as described elsewhere (16). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed with the Amplex Red<sup>R</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Peroxidase Assay kit. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $0.5 \times 10^{-4}$  mol/L) was used as a positive control. The fluorescent probe MitoSOX ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L, 30 min) was used to detect mitochondrial superoxide.

### Glutathione content, adhesion assay, and levels of cytokines and adhesion molecules

The determination of glutathione content and the parallel plate flow chamber in vitro model have been described in detail previously (8,18,19). These techniques and the drugs and solutions used are described in the Supplementary Data.

### Data analysis

Statistical analysis was carried out with R version 2.15.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Quantitative variables are expressed as mean and SD if normally distributed; if not, they are expressed as median and quartiles. The parametric data were compared with a one-way ANOVA, and nonparametric data were compared with a Kruskal-Wallis, followed in each case by a post hoc test (Student-Newman-Keuls or Dunn multiple comparison, respectively). Adjustment of variables was carried out using a univariate general linear model;

the variable to be adjusted was the dependent variable and the group (control, SMI, or absence of SMI) the independent variables. Possible confounding variables (waist circumference or BMI) were defined as covariates. The  $\chi^2$  test was used to compare proportions among groups of subjects. Pearson correlation or Spearman correlation coefficients were used to measure the strength of the association between two variables for parametric and nonparametric data, respectively. All the tests used a confidence interval of 95% and differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Clinical and metabolic characteristics

The anthropometric characteristics of type 2 diabetic patients (with or without SMI) and control subjects are presented in Table 1, which shows a higher ( $P < 0.05$ ) waist circumference among the former subjects. Fasting levels of serum TGs, HbA<sub>1c</sub>, hs-CRP, glucose, insulin, and HOMA-IR were higher in type 2 diabetic patients ( $P < 0.05$ ) (Table 1), whereas levels of HDL and LDL were lower ( $P < 0.05$ ). No changes were found with respect to type of treatment between type 2 diabetic patients with or without SMI. Statistically significant differences remained after adjustment for BMI and waist, with the exception of those between hs-CRP and insulin levels after adjustment for waist alone.

Twenty-five patients presented SMI, of which 23 were diagnosed by exercise stress testing, 1 by Holter-ECG, and 1 due to a Q wave of previous myocardial necrosis. Nineteen patients agreed to undergo the coronary angiography test.

### Mitochondrial O<sub>2</sub> consumption, membrane potential, and mitochondrial mass

An O<sub>2</sub>-tight chamber was used to monitor the rate of O<sub>2</sub> consumption in PMNs from the blood of control subjects and type 2 diabetic patients with and without SMI. The O<sub>2</sub> requirement of the cells was mainly mitochondrial, since addition of sodium cyanide resulted in almost complete (95–99%) inhibition of O<sub>2</sub> consumption (not shown). The rate of O<sub>2</sub> consumption was lower in type 2 diabetic patients and more significant among those with SMI. Figure 1A represents the reduction in O<sub>2</sub> consumption in type 2 diabetic patients with SMI ( $P < 0.001$ )

versus those without ( $P < 0.01$ ). Both TMRM ( $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI) and NAO ( $P < 0.05$  without SMI and  $P < 0.05$  with SMI), the former indicating a reduction in  $\Delta\Psi_m$  (Fig. 1B) and the latter a reduction in mitochondrial mass (Fig. 1C).

### ROS production

DCFH-DA fluorescence was significantly higher among type 2 diabetes patients but was more evident in the group with SMI ( $P < 0.01$  without SMI, and  $P < 0.001$  in the group with SMI) (Fig. 1D). Diabetic patients presented higher levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI) (Fig. 1E) and mitochondrial ROS production ( $P < 0.05$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI) (Fig. 1F). In general, the patients with SMI exhibited a higher level of ROS than those without SMI.

### GSH levels

As shown in Fig. 2A, levels of GSH were significantly lower in diabetic patients ( $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI). Figure 2B shows how the GSH/GSSG ratio was also lower among these patients ( $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI). Type 2 diabetic patients with SMI exhibited lower levels of GSH and GSH/GSSG than those without SMI ( $P < 0.001$ ), which is of great relevance with respect to oxidative stress.

### Adhesion assay under flow conditions

Type 2 diabetes was related to lower rolling velocity of PMN ( $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI) (Fig. 2C) and a significantly higher rolling flux (cells per minute;  $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI) (Fig. 2D) and PMN adhesion (cells per square millimeter;  $P < 0.01$  without SMI and  $P < 0.001$  with SMI) (Fig. 2E). These results provide evidence that type 2 diabetes is characterized by a higher frequency of leukocyte-endothelium interactions that is even more pronounced among patients with SMI than those without SMI ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2C–E). After adding tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; 10 ng/mL, 4 h) and PAF (1  $\mu$ mol/L, 1 h) (positive controls) to HUVECs and leukocytes, respectively, an increase in rolling flux ( $P < 0.001$ ) and adhesion ( $P < 0.001$ ) and a decrease of rolling velocity ( $P < 0.05$ ) were observed (Supplementary Fig. 1).

## Diabetes and endothelial mitochondrial dysfunction

Table 1—Anthropometric, clinical, and metabolic characteristics of type 2 diabetic patients (with and without SMI) and control subjects

	Control	non-SMI	SMI	P adjusted values
n	60	175	25	
Age (years)	54.2 ± 1.8	55.3 ± 1.7	56.1 ± 2.0	—
Duration of diabetes (years)		5.51 (2.03–12.02)	6.12 (2.01–11.53)	—
Mean SBP (mmHg)	125 ± 3	122 ± 2	122 ± 3	—
Mean DBP (mmHg)	74 ± 5	75 ± 3	75 ± 2	—
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.8 ± 1.4	30.3 ± 2.6	29.6 ± 2.9	—
Waist (cm)	97.6 ± 1.6 <sup>a</sup>	107.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	106.9 ± 2.2 <sup>b</sup>	—
Active smoker, %	15	19	20	—
Total cholesterol (mmol/L)	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.3	4.9 ± 0.2	P > 0.05* P > 0.05#
TG (mmol/L)	1.04 (0.86–1.41) <sup>a</sup>	2.05 (1.53–2.82) <sup>b</sup>	1.69 (1.34–2.41) <sup>b</sup>	P < 0.05* P < 0.05#
HDL (mmol/L)	1.20 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.03 <sup>b</sup>	P < 0.05* P < 0.05#
LDL (mmol/L)	3.57 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.14 <sup>b</sup>	3.03 ± 0.20 <sup>b</sup>	P < 0.05* P < 0.05#
Lipoprotein(a) (μmol/L)	0.22 (0.11–0.62)	0.19 (0.12–0.69)	0.19 (0.11–0.68)	P > 0.05* P > 0.05#
HbA <sub>1c</sub> (%)	3.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	7.4 ± 0.9 <sup>b</sup>	P < 0.05* P < 0.05#
hs-CRP (mg/L)	1.62 (0.60–2.13) <sup>a</sup>	3.74 (1.52–4.91) <sup>b</sup>	3.83 (1.42–5.13) <sup>b</sup>	P < 0.05* P > 0.05#
Glucose (mmol/L)	5.4 (3.8–7) <sup>a</sup>	9.2 (7.1–13.9) <sup>b</sup>	8.3 (6.7–14.4) <sup>b</sup>	P < 0.05* P < 0.05#
Insulin (pmol/L)	60 (41–76) <sup>a</sup>	100 (63–137) <sup>b</sup>	98 (74–140) <sup>b</sup>	P < 0.05* P > 0.05#
HOMA-IR	3.1 (2.2–5.4) <sup>a</sup>	10.6 (6.6–11.4) <sup>b</sup>	12.3 (7.1–14.3) <sup>b</sup>	P < 0.05* P < 0.05#
	Treatment			
Treatment with metformin, %		61	54	—
Treatment with glitazone, %		15	21	—
Treatment with sulphonylurea, %		29	21	—
Treatment with statin, %		48	55	—
Treatment with fibrate, %		18	12	—

Data are expressed as mean ± SD for parametric data or as median (25th and 75th percentiles) for nonparametric data. Different superscript letters (a and b) indicate significant differences among the groups (a is different from b) ( $P < 0.05$ ) when compared by means of one-way ANOVA or Kruskal-Wallis for parametric and nonparametric data, respectively, followed by a post hoc test or  $\chi^2$  test to compare proportions between groups. HOMA-IR = fasting insulin (mU/mL) × fasting glucose (mmol/L)/22.5. DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure. \* $P$  value after adjusting for BMI. # $P$  value after adjusting for waist circumference.

## Levels of cytokines and adhesion molecules

Type 2 diabetes was related to a significant increase in the levels of proinflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6;  $P < 0.05$  in both groups) and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$  without SMI and  $P < 0.01$  with SMI) (Table 2) and higher levels of the adhesion molecules VCAM-1 and E-selectin ( $P < 0.05$  without SMI and  $P < 0.01$  with SMI). Type 2 diabetes was characterized by higher levels of proinflammatory cytokines and adhesion molecules, which were even higher in diabetic patients with SMI than those without SMI, with the exception of IL-6 ( $P < 0.05$ ).

After adjusting for BMI and waist circumference, significant differences remained between the groups in relation to

IL-6, TNF- $\alpha$ , and E-selectin but disappeared in the case of VCAM-1. No significant differences in VCAM-1 levels were observed between the groups.

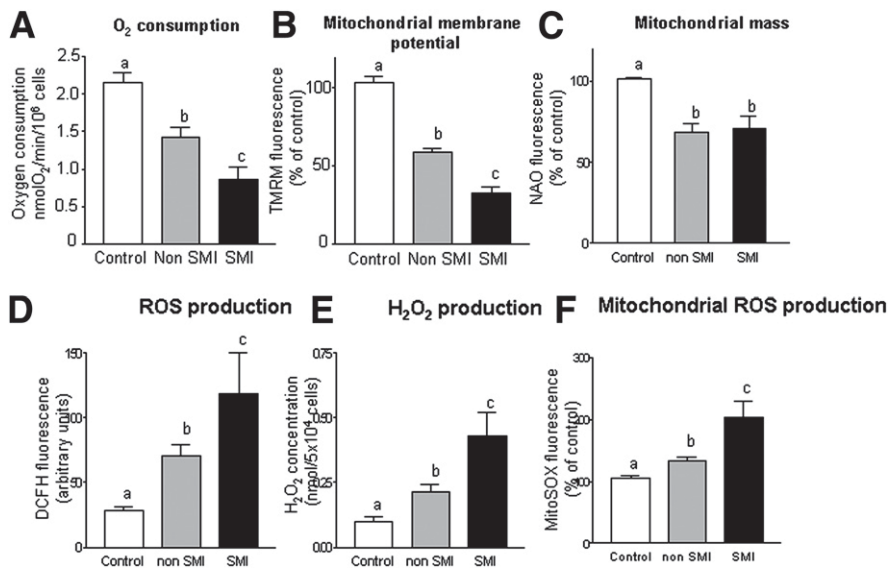
## Correlation studies

We studied possible correlations between leukocyte mitochondrial function, ROS (both total and mitochondrial), and leukocyte-endothelial interactions and type 2 diabetic patients with and without SMI (Supplementary Table 1).

Mitochondrial O<sub>2</sub> consumption was positively correlated with rolling velocity in SMI patients ( $r = 0.954$ ,  $P < 0.001$ ) and negatively correlated with PMN rolling in non-SMI patients ( $r = -0.770$ ,  $P < 0.05$ ) and with PMN adhesion in both groups

( $r = -0.979$  and  $P < 0.001$ ,  $r = -0.873$  and  $P < 0.05$ , in non-SMI and SMI patients, respectively). Membrane potential was negatively correlated with PMN rolling in SMI patients ( $r = -0.765$ ,  $P < 0.05$ ) and with PMN adhesion in both groups ( $r = -0.865$  and  $P < 0.01$ ,  $r = -0.929$  and  $P < 0.01$ , in non-SMI and SMI patients, respectively). ROS was positively correlated with PMN rolling ( $r = 0.820$  and  $P < 0.05$ ,  $r = 0.777$  and  $P < 0.05$  in non-SMI and SMI patients, respectively) and with PMN adhesion ( $r = 0.965$  and  $P < 0.001$ ,  $r = 0.838$  and  $P < 0.05$ , in non-SMI and SMI patients, respectively). Interestingly, mitochondrial ROS production was negatively correlated with rolling velocity ( $r = -0.814$ ,





**Figure 1**—Effects of type 2 diabetes on oxygen consumption and mitochondrial membrane potential and mass. A:  $O_2$  consumption in control subjects ( $n = 30$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 47$ ) in a closed respiration chamber measured as  $\text{nmol } O_2/\text{min}/\text{million cells}$ . B: Mitochondrial membrane potential (TMRM fluorescence, % of control) in control subjects ( $n = 29$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 68$ ). C: Mitochondrial mass (NAO fluorescence, % of control) in control subjects ( $n = 60$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 80$ ). Effects of type 2 diabetes on ROS. D: Changes in the fluorescence of DCFH in control subjects ( $n = 37$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 50$ ). E:  $H_2O_2$  production in control subjects ( $n = 28$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 25$ ). F: Mitochondrial ROS production (MitoSOX fluorescence, % of control) in control subjects ( $n = 25$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 38$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Different letters (a, b, and c) indicate significant differences among groups (a is different from b, a is different from c, and b is different from c) ( $P < 0.05$ ) when compared by means of one-way ANOVA followed by a post hoc test.

$P < 0.05$ ) and positively correlated with PMN rolling ( $r = 0.848$ ,  $P < 0.05$ ) and with PMN adhesion ( $r = 0.989$ ,  $P < 0.001$ ) in SMI patients but not in non-SMI patients.

Regarding mitochondrial parameters,  $O_2$  consumption was negatively correlated with ROS production in both groups ( $r = -0.407$  and  $P < 0.05$ ,  $r = -0.647$  and  $P < 0.01$ , in non-SMI and SMI patients, respectively). Mitochondrial membrane potential was negatively correlated with mitochondrial ROS in SMI patients ( $r = -0.468$ ,  $P < 0.05$ ) but not in non-SMI patients.

**CONCLUSIONS**—We can report an increase in fasting levels of TG,  $HbA_{1c}$ , hs-CRP, glucose, insulin, and HOMA-IR in type 2 diabetic patients. Given that waist circumference and BMI were also higher in this group (but significantly only in the former case), we adjusted the data for these parameters. However, statistical differences remained, except between hs-CRP and insulin levels after adjustment for waist.

We observed a prevalence of SMI of 12.5%, which falls within the range of 10 to 20% attributed to the diabetic population (20). Furthermore, mitochondrial dysfunction (defined as a decrease in  $O_2$  consumption and membrane potential and an increase in mitochondrial ROS production) in PMNs was identified as a characteristic of type 2 diabetes and was found to correlate with the presence of SMI. This effect was evident in the decrease in mitochondrial  $O_2$  consumption, membrane potential, mitochondrial mass, GSH levels, and GSH/GSSG ratio and the increase in mitochondrial ROS production observed in these patients. Furthermore, we have observed how type 2 diabetes induces leukocyte-endothelium interactions by undermining PMN rolling velocity and increasing rolling flux and adhesion, which is accompanied by a simultaneous increase in proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  and adhesion molecules. These effects on the parameters under study were more evident in the SMI group, which

may partially explain the increase of SMI and cardiovascular events during type 2 diabetes.

Our results provide evidence that the rate of mitochondrial dysfunction correlates with SMI in type 2 diabetes. It has been reported that leukocytes from patients with oxidative stress are in a proinflammatory state expressed by a heightened sensitivity to physiologic hyperglycemia and elevated plasma CRP (21).

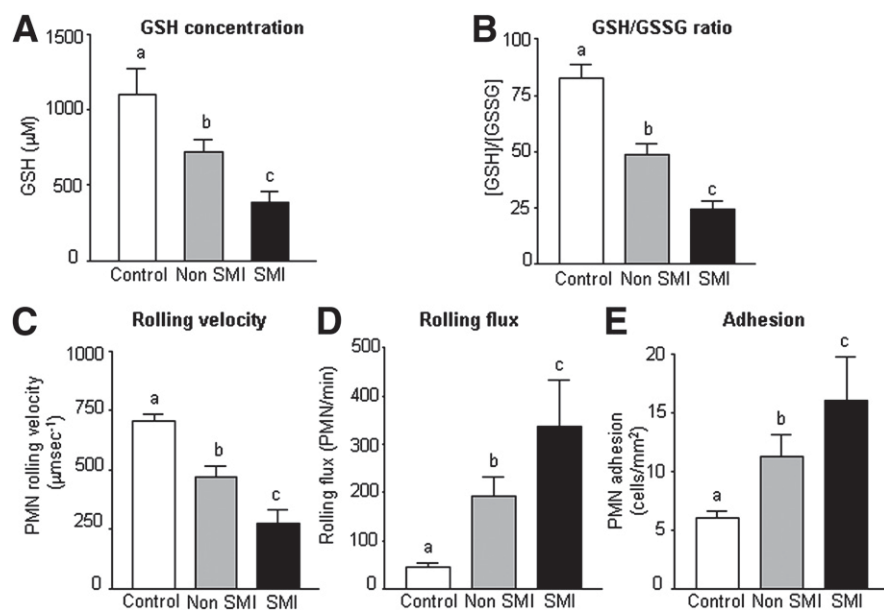
It has been described that insulin signaling per se also regulates myocardial mitochondrial  $O_2$  consumption and rates of ATP synthesis (22,23). The studies in question demonstrated a coordinated reduction in fatty acid enzymes and tricarboxylic acid that appeared to impair the delivery of reducing equivalents to the electron transport chain. Additionally, mitochondria from insulin receptor-deficient myocytes were found to be more susceptible to fatty acid-induced oxidative stress and mitochondrial uncoupling. These data highlight the important role of the insulin signaling pathway in modulating mitochondrial bioenergetics and integrity. Our results show that mitochondrial dysfunction may be related to the onset of SMI. Given that SMI seems to be a predictor of CVD driven by increased cardiovascular risk markers, it may be of relevance to monitor mitochondrial function as a marker of the appearance and prevalence of SMI.

In addition to mitochondrial dysfunction, insulin resistance in patients with type 2 diabetes is characterized by reduced maximal  $O_2$  consumption (24). This parameter is positively correlated with insulin sensitivity and is considered to be a strong determinant of the insulin sensitivity index (25–27). In skeletal muscle of obese subjects and patients with type 2 diabetes, mitochondrial dysfunction appears to be caused by a lower number and decreased functional capacity of mitochondria (25,28).

Oxidative stress and ROS-mediated mitochondrial dysfunction are both major mechanisms of mitochondrial dysfunction. In the present work, we have demonstrated a higher production of mitochondrial ROS by leukocytes of type 2 diabetic patients in basal conditions, which is more pronounced among those with SMI.

ROS can be released from the endothelium and inflammatory cells, inducing oxidative damage (29). Indeed, excessive amounts of ROS are generally harmful to cells, as they can provoke lipid peroxidation and apoptosis. The antioxidant system of

## Diabetes and endothelial mitochondrial dysfunction



**Figure 2**—A: The levels of GSH in control subjects ( $n = 36$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 36$ ). B: The GSH/GSSG ratio in control subjects ( $n = 37$ ) and type 2 diabetic patients with ( $n = 25$ ) or without SMI ( $n = 38$ ). Effects of type 2 diabetes on C: PMN rolling velocity ( $\mu\text{m sec}^{-1}$ ) ( $n = 10$  per group), D: rolling flux (PMN/min) ( $n = 10$  per group), and E: PMN adhesion (PMN/ $\text{mm}^2$ ) ( $n = 10$  per group). Data are expressed as mean + SEM. Different letters (a, b, and c) indicate significant differences among the groups (a is different from b, a is different from c, and b is different from c) ( $P < 0.05$ ) when compared by means of one-way ANOVA followed by a post hoc test.

organisms neutralizes the damaging effects of ROS and, together with GSH, plays a vital role in protecting cells from oxidative stress (30). In this way, an increase in the production of ROS, a decrease in GSH levels and the GSH/GSSG ratio, and a reduction in the mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass, all of which are characteristics of diabetes, are likely to lead to dysfunction within the respiratory chain,

which subsequently compromises the functioning of mitochondria as a source of energy. Mitochondria are known to be an important site for the generation of ROS, which are highly toxic to various sites of the mitochondrial respiratory chain. The inhibition of complex I is the most likely consequence of this toxicity.

Pathophysiological states such as atherosclerosis and hypertension are characterized

by leukocyte recruitment to the arterial wall. To study this process, we have used an in vitro model in which human leukocytes flow over a monolayer of human endothelial cells with a shear stress similar to that observed in vivo (31). This reproduces the process that precedes inflammation in vivo (rolling and adhesion) and that is critical to homeostasis and vascular cell integrity. If these interactions are exacerbated, the vascular dysfunction and injury associated with many CVDs can occur (32). Our experimental system has been widely applied to visualize and analyze the multistep recruitment of leukocytes in these diseases, and allows the mechanisms of action implicated in this recruitment to be assessed (33,34). In the current study, we have observed how type 2 diabetes induces a significant increase in rolling flux and PMN adhesion and a decrease in the rolling velocity of PMN. These effects seem to directly correlate with SMI, as they were more pronounced in SMI patients in all cases. Thus, we can demonstrate that mitochondrial ROS production fully correlates with adhesion, rolling, and rolling velocity in type 2 diabetic patients with SMI. In relation to this, it is known that the causal link between elevated glucose and hyperglycemic damage is the increased production of ROS by mitochondria (35). Furthermore, increases in leukocyte-endothelium interactions have been related to oxidative stress in a model of insulin resistance (19). The present findings demonstrate a higher increase of ROS in diabetic patients with SMI. This is relevant, as ROS promotes a proinflammatory/prothrombotic phenotype within the vasculature by different mechanisms (36), including the inactivation of nitric oxide, the activation of redox-sensitive transcription factors (e.g., nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ) that govern the expression of endothelial cell adhesion molecules, and the activation of enzymes (e.g., phospholipase A[2]) that produce leukocyte-stimulating inflammatory mediators.

Our data are in accordance with the evidence associating capillary occlusion by leukocytes with extravascular macrophage accumulation in animal models of diabetes (34). Additionally, an intravital microscopy study in which rats were made diabetic by streptozotocin injection has provided evidence that the diabetic state induces lower venular shear rates and an increased number of rolling leukocytes in mesenteric venules with respect to nondiabetic animals (37).

**Table 2**—Cytokines and adhesion molecules in the serum of type 2 diabetic patients (with and without SMI) and control subjects

	Control	non-SMI	SMI	P adjusted values
IL-6 (pg/mL)	1.8 (1.2–3.1) <sup>a</sup>	3.6 (2.0–4.2) <sup>b</sup>	3.9 (2.2–3.4) <sup>b</sup>	$P < 0.05^*$ $P < 0.05\#$
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	3.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	11.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	$P < 0.05^*$ $P < 0.05\#$
VCAM-1 (ng/mL)	892 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	1,029 $\pm$ 61 <sup>b</sup>	1,285 $\pm$ 102 <sup>b</sup>	$P < 0.05^*$ $P > 0.05\#$
ICAM-1 (ng/mL)	166 $\pm$ 69	153 $\pm$ 46	178 $\pm$ 25	$P > 0.05^*$ $P > 0.05\#$
E-selectin (ng/mL)	23 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	49 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	68 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	$P < 0.05^*$ $P < 0.05\#$

Data are expressed as mean  $\pm$  SD for parametric data or as median (25th and 75th percentiles) for non-parametric data. Different superscript letters (a and b) indicate significant differences among the groups (a is different from b) ( $P < 0.05$ ) when compared by means of one-way ANOVA or Kruskal-Wallis for parametric and nonparametric data, respectively, followed by a post hoc test. \*P value after adjusting for age. #P value after adjusting for waist circumference.

Endothelial activation can be assessed by measurement of the soluble adhesion molecules E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1. In general, circulating levels of adhesion molecules are elevated in patients with type 2 diabetes (38) and are upregulated in healthy individuals in response to systemic inflammation (39). In the current study, we have observed an increase in adhesion molecules in accordance with a rise in the number of leukocyte-endothelium interactions and selectins that mediate the initial tethering and subsequent rolling of leukocytes. The elevated levels of adhesion molecules observed in the serum of type 2 diabetic patients are of particular interest given that they provide strong evidence of an ongoing inflammatory process in the endothelium that could, theoretically, lead to CVD. Furthermore, we have observed an increase in proinflammatory levels of the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 in type 2 diabetic patients, and an enhanced release of TNF- $\alpha$  from leukocytes after activation by ROS-induced oxidative stress may inhibit insulin signaling and impair glucose uptake (40).

In conclusion, the current study provides evidence of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and endothelium-inducing leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes. These alterations are more pronounced in patients with SMI, which suggests a correlation between the rate of mitochondrial dysfunction and leukocyte-endothelium interactions on the one hand and the prevalence/appearance of SMI in diabetes on the other. Future exploration of this oxidative stress may help to clarify the nature of the molecular mechanisms involved and the physiological significance of insulin resistance in type 2 diabetic patients with SMI. Such knowledge would no doubt help to develop strategies to reduce the risk of the onset of type 2 diabetes.

**Acknowledgments**—This study was financed by grants PI10/1195, PI09/01025, SAF2010-16030, CIBERhd CB06/04/0071, PROMETEO 2010/060, ACOMP/2012/042, and ACOMP/2012/045 and by the European Union from the European Regional Development Fund. C.d.P. is funded by an FPI grant (BES-2008-04338), and A.A. is the beneficiary of the Ramón y Cajal (RYC2005-02295) and I3 programs from the Ministry of Science and Innovation. V.M.V. and M.R. are recipients of contracts from the Regional Ministry of Health of the Valencian Regional Government and

Carlos III Health Institute (CES10/030 and CP10/0360, respectively).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

A.H.-M. contributed to the discussion and wrote, reviewed, and edited the manuscript. M.R. researched data, contributed to the discussion, and reviewed and edited the manuscript. S.R.-L. researched data and contributed to the discussion. C.B. and L.B. researched data. C.d.P., I.R.-T., and E.S.-I. reviewed and edited the manuscript. A.A. contributed to the discussion and reviewed and edited the manuscript. V.M.V. wrote, reviewed, and edited the manuscript. A.H.-M. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors thank B. Normanly for his editorial assistance (University of Valencia) and Isabel Soria for her work in the extraction of the biological samples (University Hospital Dr. Peset).

#### References

- Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241:2035–2038
- Fava S, Azzopardi J, Muscat HA, Fenech FF. Factors that influence outcome in diabetic subjects with myocardial infarction. *Diabetes Care* 1993;16:1615–1618
- Scheuermann-Freestone M, Madsen PL, Manners D, et al. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation* 2003;107:3040–3046
- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 2005;112:2686–2695
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 2000;355:773–778
- Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2006;55:798–805
- Park SY, Cho YR, Kim HJ, et al. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes* 2005;54:3530–3540
- Hernandez-Mijares A, Rocha M, Apostolova N, et al. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 2011;50:1215–1221
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 2008;118:789–800
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191–1212
- Anderson EJ, Yamazaki H, Neuffer PD. Induction of endogenous uncoupling protein 3 suppresses mitochondrial oxidant emission during fatty acid-supported respiration. *J Biol Chem* 2007;282:31257–31266
- Victor VM, Rocha M, Bañuls C, et al. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3505–3512
- Jude EB, Douglas JT, Anderson SG, Young MJ, Boulton AJ. Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* 2002;13:185–189
- Gibbons RJ, Balady GJ, Bricker JT, et al.; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Committee to Update the 1997 Exercise Testing Guidelines. ACC/AHA 2002 guideline update for exercise testing: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1997 Exercise Testing Guidelines). *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1531–1540
- Klocke FJ, Baird MG, Lorell BH, et al.; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Society for Nuclear Cardiology. ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of cardiac radionuclide imaging—executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASNC Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Clinical Use of Cardiac Radionuclide Imaging). *Circulation* 2003;108:1404–1418
- Esplugues JV, Rocha M, Nuñez C, et al. Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. *Circ Res* 2006;99:1067–1075
- Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Moran A, Alvarez A, Blas-Garcia A, Esplugues JV. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *Br J Pharmacol* 2010;160:2069–2084
- De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction

*Diabetes and endothelial mitochondrial dysfunction*

- between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010;24:1259–1266
19. Victor VM, Rocha M, Bañuls C, et al. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3115–3122
  20. Scheidt-Nave C, Barrett-Connor E, Wingard DL. Resting electrocardiographic abnormalities suggestive of asymptomatic ischemic heart disease associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus in a defined population. *Circulation* 1990;81:899–906
  21. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JMC, Sattar N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2453–2455
  22. Boudina S, Bugger H, Sena S, et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation* 2009;119:1272–1283
  23. Sena S, Hu P, Zhang D, et al. Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:910–918
  24. Højlund K, Beck-Nielsen H. Impaired glycogen synthase activity and mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: markers or mediators of insulin resistance in type 2 diabetes? *Curr Diabetes Rev* 2006;2:375–395
  25. Fleg JL, Piña IL, Balady GJ, et al. Assessment of functional capacity in clinical and research applications: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* 2000;102:1591–1597
  26. Rodnick KJ, Haskell WL, Swislocki AL, Foley JE, Reaven GM. Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. *Am J Physiol* 1987;253:E489–E495
  27. Rosenthal M, Haskell WL, Solomon R, Widstrom A, Reaven GM. Demonstration of a relationship between level of physical training and insulin-stimulated glucose utilization in normal humans. *Diabetes* 1983;32:408–411
  28. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2944–2950
  29. Diao FY, Xu M, Hu Y, et al. The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol* 2004;33:59–72
  30. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4:327–347
  31. Ibiza S, Alvarez A, Romero W, Barrachina MD, Esplugues JV, Calatayud S. Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:C1588–C1595
  32. Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14:44S–54S
  33. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007;101:234–247
  34. Yang XD, Michie SA, Mebius RE, Tisch R, Weissman I, McDevitt HO. The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM: implications for pathogenesis and therapy. *Diabetes* 1996;45:705–710
  35. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787–790
  36. Cooper D, Stokes KY, Taylor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2002;2:165–180
  37. Panés J, Kurose I, Rodriguez-Vaca D, et al. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation* 1996;93:161–167
  38. Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004;291:1978–1986
  39. Lemaire LC, de Kruif MD, Giebelen IA, van Zoelen MA, van't Veer C, van der Poll T. Differential dose-dependent effects of prednisolone on shedding of endothelial adhesion molecules during human endotoxemia. *Immunol Lett* 2008;121:93–96
  40. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:336–340

## SUPPLEMENTARY DATA

**Drugs and solutions**

Kits for glucose, insulin, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoproteins (HDL) and low density lipoproteins (LDL) were purchased from Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA). Lpa and (hs-CRP) kits were supplied by Beckman Corp (Brea, A, USA). The HbA1c kit was purchased from Menarini Diagnostics (Florence, Italy).

Sodium cyanide, NADH, glucose, trypan blue, arginine, glutathione reductase, NEM, BPDS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, haemoglobin, RPMI1640 supplemented with 20 mM HEPES, HBSS and fibronectin were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA). Dextran was acquired from Fluka (St. Louis, MO, USA). HBSS was supplied by Cambrex (Verviers, Belgium). DCFH-DA was provided by Calbiochem (San Diego, CA, USA). TMRM was supplied by Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Dulbecco's PBS with (DPBS<sup>+</sup>) or without (DPBS<sup>-</sup>) Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, endothelial cell growth medium culture media and foetal bovine serum were obtained from LONZA (Verviers, Belgium). Recombinant TNF- $\alpha$ , human serum albumin (HSA, Albuminate 25%) and Ficoll-Paque TM Plus were purchased from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Plastic coverslips with a diameter of 25 mm were obtained from Nunc (supplied by Thermo Fisher Scientific). PBS, collagenase, and trypsin-EDTA were obtained from Invitrogen (Eugene, OR, USA).

**Determination of glutathione content**

An HPLC method was used to evaluate whole blood (collected in heparinised tubes) for GSH and GSSG. For determination of GSSG, blood samples (0.5 mL) were treated at 4°C with 0.5 mL ice-cold perchloric acid (12%) containing 40x10<sup>-3</sup> mol/L N-ethylmaleimide (NEM) - in order to prevent GSH oxidation - and with 2 mM bathophenanthroline disulfonic acid (BPDS), as described by Asensi et al.(1994) (1). To measure total glutathione, blood (0.5 mL) was treated at 4°C with 0.5 mL trichloroacetic acid (30%). Samples were then centrifuged at 15,000g for 5 min at 4°C and the acidic supernatants were used for measurement of GSH, GSSG and total glutathione.

For GSSG determinations, 0.5 mL of the acidic supernatants were derivatized by adding 50  $\mu$ L of 1 mM  $\gamma$ -glutamyl-glutamate prepared in 0.3% perchloric acid. Afterwards, pH was adjusted to 8.0 with KOH (2 mol/L). Samples were then centrifuged and a 25  $\mu$ L aliquot of the supernatant was mixed with 50  $\mu$ L of 1% 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Derivatization was subsequently completed in 45 min and desiccated samples were maintained stable at -20°C until injection. This procedure reduces GSH oxidation in blood to about 1%.

**Adhesion assay. Levels of cytokines and adhesion molecules**

The parallel plate flow chamber *in-vitro* model has been described in detail previously (2-3). For adhesion assays, coverslips containing confluent HUVEC monolayers were inserted into a circular recess in the bottom plate of the flow chamber (maintained at 37°C), to which a portion (5x25mm) of the endothelial cells were exposed. The entire chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S, Amstelveen, The Netherlands) connected to a video camera. Experiments were performed using a 40x objective lens. PMNs were resuspended in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) containing 20x10<sup>-3</sup> mol/L HEPES and 0.1% human serum albumin at 1x10<sup>6</sup> cells/mL and were then drawn across the HUVEC monolayer at a controlled flow rate of 0.36 mL/min (estimated shear stress of 0.7 dyne/cm<sup>2</sup>). A circular glass window in the top plate of the chamber allowed microscopic examination of the monolayer exposed to the flow in real time. Images in a single field of view were recorded over a 5-min period during which leukocyte parameters were determined. Leukocyte rolling was calculated by counting the number of leukocytes rolling over 100  $\mu$ m<sup>2</sup> of the endothelial monolayer during a 1-min period. The velocity of 20 consecutive leukocytes in the field of focus was determined by measuring the time required to travel a distance of 100  $\mu$ m. Adhesion was evaluated by counting the number of PMN that maintained stable contact with the HUVEC for 30 s. Tumoral necrosis factor

## SUPPLEMENTARY DATA

(TNF- $\alpha$ , 10 ng/mL, 4h) and platelet activating factor (PAF, 1  $\mu$ mol/L, 1h) were used as positive controls for HUVEC and leukocytes, respectively. A Luminex 100 flow analyser system was employed to analyse VCAM-1, E-selectin, ICAM-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum from controls and diabetic patients (Austin, TX, USA).

1. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994;234:367-371.
2. De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010; 24:1259-1266.
3. Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, Gomez M, Hernandez-Mijares A. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.*2011;96:3115-22.

## SUPPLEMENTARY DATA

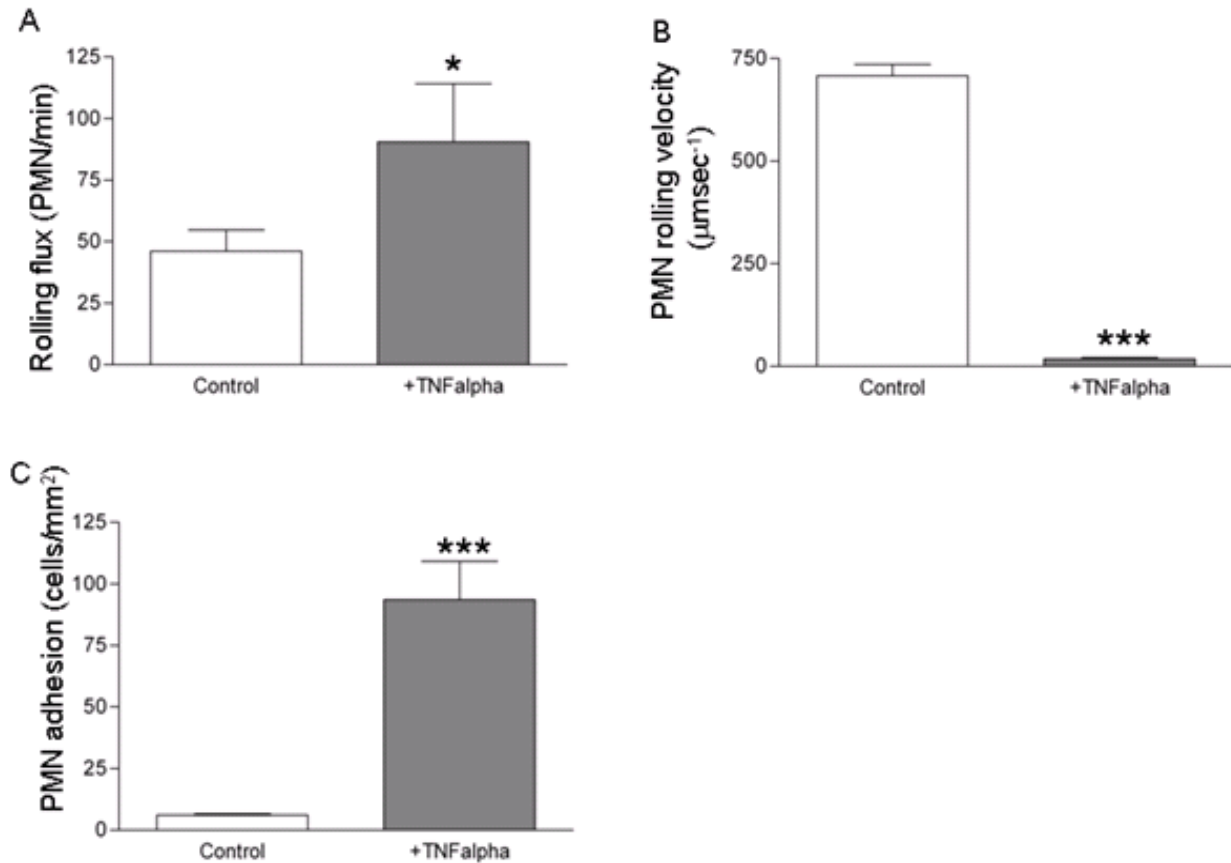
**Supplementary Table 1.** Correlation coefficient of leukocyte mitochondrial function, ROS (total and mitochondrial) and leukocyte-endothelial interactions in diabetic patients with and without SMI.

	Rolling velocity		Rolling flux		Adhesion		O <sub>2</sub> Consumption		$\Delta\Psi_m$	
	r	P value	r	P value	r	P value	r	P value	r	P value
<b>Without SMI</b>										
O <sub>2</sub> Consumption	0.628	0.095	-0.770	0.025	-0.979	<0.001	-----	-----	-----	-----
$\Delta\Psi_m$	0.294	0.479	-0.706	0.050	-0.865	0.005	-----	-----	-----	-----
ROS	-0.387	0.344	0.820	0.013	0.965	<0.001	-0.407	0.011	0.128	0.358
Mitochondrial ROS	-0.132	0.777	0.548	0.203	0.744	0.055	-0.312	0.060	-0.115	0.491
<b>With SMI</b>										
O <sub>2</sub> Consumption	0.954	<0.001	-0.683	0.091	-0.873	0.010	-----	-----	-----	-----
$\Delta\Psi_m$	0.622	0.135	-0.765	0.045	-0.929	0.002	-----	-----	-----	-----
ROS	-0.616	0.141	0.777	0.040	0.838	0.018	-0.647	0.006	-0.156	0.563
Mitochondrial ROS	-0.814	0.026	0.848	0.016	0.989	<0.001	-0.412	0.071	-0.468	0.037

Correlation coefficients were estimated by Pearson's correlation for parametric parameters or Spearman's correlation when data were not normally distributed.

## SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary Figure 1.** Effects of tumoral necrosis factor (TNF- $\alpha$ , 10 ng/mL, 4h) and platelet activating factor (PAF, 1  $\mu$ mol/L, 1h) (used as positive controls for HUVEC and leukocytes, respectively) on PMN from control subjects. PMN rolling velocity (microsecond-1) (A), rolling flux (PMN per minute) (B) and PMN adhesion (PMN per square millimetre) (C). Data are expressed as percentage or mean + SEM. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared by an independent T-test.







## NEWS &amp; VIEWS

## Is Myeloperoxidase a Key Component in the ROS-Induced Vascular Damage Related to Nephropathy in Type 2 Diabetes?

Susana Rovira-Llopis,<sup>1,2,\*</sup> Milagros Rocha,<sup>1-3,\*</sup> Rosa Falcon,<sup>1,2</sup> Carmen de Pablo,<sup>4</sup> Angeles Alvarez,<sup>4,5</sup> Ana Jover,<sup>2</sup> Antonio Hernandez-Mijares,<sup>1-3,6</sup> and Victor M. Victor<sup>1-3,7</sup>

### Abstract

It is still unclear whether microvascular complications of type 2 diabetes correlate with leukocyte-endothelium interactions and/or myeloperoxidase (MPO) levels. In the present study, we found that serum levels of glucose, the rate of ROS and MPO concentration were higher in type 2 diabetic patients. Patients with nephropathy (39.6%) presented higher MPO levels that correlate positively with the albumin/creatinine ratio ( $r=0.59$ ,  $p<0.05$ ). In addition, nephropathic patients showed increased leukocyte-endothelium interactions due to an undermining of polymorphonuclear leukocytes (PMN) rolling velocity and increased rolling flux and adhesion, which was accompanied by a rise in levels of the proinflammatory cytokine tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and the adhesion molecule E-selectin. Furthermore, MPO levels were positively correlated with PMN rolling flux ( $r=0.855$ ,  $p<0.01$ ) and adhesion ( $r=0.682$ ,  $p<0.05$ ). Our results lead to the hypothesis that type 2 diabetes induces oxidative stress and an increase in MPO levels and leukocyte-endothelium interactions, and that these effects correlate with the development of nephropathy. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1452–1458.

### Introduction

**H**YPERGLYCEMIA FREQUENTLY INDUCES endothelial dysfunction in diabetic patients, which can lead to micro- and macro-vascular complications (5). The severity of type 2 diabetic complications normally correlates with plasma glucose levels, and the inflammation provoked by their deregulation can contribute to insulin resistance, not only in the adipose tissue, but also in target organs, such as liver, kidney or skeletal muscle, thereby aggravating the diabetic state.

Low-grade chronic inflammation and endothelial dysfunction contribute to the initiation and progression of microvascular complications associated with type 2 diabetes. In fact, endothelial dysfunction parallels microalbuminuria in diabetes, while diabetes leads to ultrastructural alterations in

### Innovation

To date, there are few studies specifically focusing on the relationship between myeloperoxidase (MPO) levels and type 2 diabetes and their results are controversial. Our results show that the concentration of MPO in type 2 diabetes patients is notably elevated and there is a positive correlation between MPO levels and diabetic nephropathy. Furthermore, levels of cytokines, adhesion molecules, and leukocyte-endothelium interactions are increased in type 2 diabetes patients and these increases are exacerbated by the presence of nephropathy. These observations raise the question of a putative role of MPO in the development of diabetic nephropathy mediated by endothelial dysfunction.

<sup>1</sup>Fundacion para la Investigacion Sanitaria y Biomedica de la Comunidad Valenciana FISABIO, Endocrinology Service, University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Endocrinology Service, University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain.

<sup>3</sup>Fundacion para la Investigacion (INCLIVA), Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

<sup>4</sup>Department of Pharmacology and CIBER CB06/04/0071 Research Group, CIBER Hepatic and Digestive Diseases, University of Valencia, Valencia, Spain.

<sup>5</sup>Fundación General de la Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

Departments of <sup>6</sup>Medicine and <sup>7</sup>Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

\*These authors contributed equally to this study.

the glomerular filtration barrier and loss of endothelial factors carriers in the kidney (2). Diabetic nephropathy contributes in a large way to the main causes of mortality related with diabetes, such as cardiovascular disease (CVD), cardiac insufficiency and infectious processes. The presence of microalbuminuria in diabetic patients can be associated with higher mortality, and, if arterial hypertension is also present, the risk of mortality is even greater.

It has been suggested that myeloperoxidase (MPO), a heme protein derived from leukocytes, plays a key role in leukocyte-mediated vascular injury responses in inflammatory CVD. MPO is released from activated leukocytes at inflammatory sites, generating reactive oxygen species (ROS). However, the antimicrobial activity of MPO can also produce oxidative damage in the endothelium and vessel wall; thus, promoting CVD and clinical complications (9). Only a few studies have explored the relationship between MPO and type 2 diabetes, and their results are controversial.

The inflammatory response to a bacterial infection is initiated when leukocytes migrate from the blood into the affected tissue. This results in adhesion of leukocytes to the vascular endothelium and chemotax towards the site of infection, where bacteria are killed by phagocytosis and ROS generation. Bacteria clearance is impaired in type 2 diabetes, which affects blood circulation; thus, increasing the recruitment of leukocytes (8). Diabetes-related complications are often related with the endothelial dysfunction caused by hyperglycemia, which usually involves increased leukocyte-endothelial interactions and, therefore, leukocyte recruitment. However, contradictory data exist regarding leukocyte-endothelial cell interactions in models of inflammation, with both higher and lower rates having been reported, as well as elevated levels of adhesion molecules.

The present study was carried out to evaluate the relationship between MPO, leukocyte activation and the increase of leukocyte-endothelium interactions observed in type 2 diabetes and to explore a possible correlation between these factors and nephropathy.

### Clinical and Metabolic Characteristics

The anthropometric and metabolic characteristics of type 2 diabetic patients and control subjects are presented in Table 1. Fasting levels of serum glucose were higher in type 2 diabetic patients ( $p < 0.05$ ) (Table 1). Chronic complication of type 2

TABLE 1. SUBJECT BASELINE CHARACTERISTICS

	Controls	Type 2 diabetic patients
Age (years)	50.1 ± 7.6	53.4 ± 6.7
Duration of diabetes mellitus (years)		13.1 ± 9.2
Hypertension	40.9%	52.8%
Mean SBP (mmHg)	132.4 ± 4.9	137.6 ± 2.3
Mean DBP (mmHg)	82.5 ± 11.9	77.1 ± 9.4
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	28.8 ± 0.9	30.2 ± 0.4
Active smoker	18.0%	19.0%
Blood glucose (mg/dl)	102.6 ± 23.3	165.9 ± 64.9 <sup>a</sup>
HbA1c (%)	—	7.2 ± 1.6

Variables are expressed as mean ± standard deviation. The results of categorical variables are expressed in percentages.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  respect to control.

DBP, diastolic blood pressure; HbA1c, glycosylated haemoglobin; SBP, systolic blood pressure.

diabetes in the form of nephropathy was detected among some (39.6%) of our subjects. In terms of the oral antidiabetic treatment received by patients, 58.2% were treated with metformin, 8.95% with glitazone, and 39.7% with sulphonylurea or glinide. About 39.6% of patients received insulin treatment. With respect to hypolipemiant treatment, 46.1% of patients received statins and 8.0% received fibrate. With regard to antihypertensive drugs, 42.4% of patients received angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II-receptor treatment and 25.0% received diuretic treatment.

### ROS production and MPO levels

DCFH-DA fluorescence was significantly higher in leukocytes from type 2 diabetic patients (Fig. 1A), as seen also by static cytometry (Fig. 1B) and fluorescence microscopy (Fig. 1C); thus, showing an increase in ROS production and, consequently, conditions of oxidative stress. Therefore, we evaluated the levels of MPO in serum from type 2 diabetic patients and controls and found that they were higher among the former ( $p < 0.05$ , Fig. 2A). In addition, we assessed MPO levels of patients grouped according to the presence or absence of nephropathy. MPO levels were significantly higher in patients with nephropathy compared to controls, but not in patients without nephropathy compared to controls

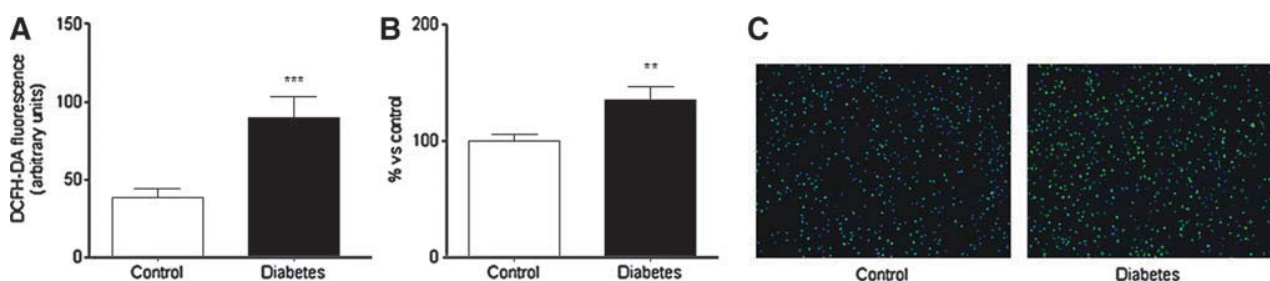
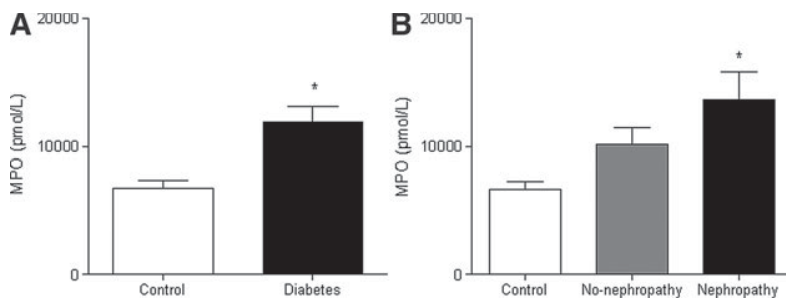


FIG. 1. Effects of type 2 diabetes on levels of ROS in PMN. (A) Alterations in the fluorescence of DCFH-DA measured by fluorimetry; (B) Mean DCFH fluorescence assessed by static cytometry; % versus control. (C) DCFH-DA fluorescence in PMNs assessed by fluorescence microscopy; nuclei: Hoechst 33342 signal (blue); ROS: DCFH-DA signal (green). \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  versus control. DCFH-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; PMN, polymorphonuclear leukocytes; ROS, reactive oxygen species. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars)



**FIG. 2.** Effects of type 2 diabetes on MPO concentration. Serum MPO concentration compared between type 2 diabetic patients and control subjects (A) and between type 2 diabetic patients with or without nephropathy and control subjects (B). \* $p < 0.05$ . MPO, myeloperoxidase.

(Fig. 2B). A correlation study revealed a positive correlation between serum MPO levels and the urinary albumin: creatinine ratio in type 2 diabetic patients with nephropathy ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.05$ ).

#### Adhesion assay under flow conditions

In light of the correlation observed between MPO levels and nephropathy in our type 2 diabetic patients, and due that pathophysiological states are characterized by leukocyte recruitment to the arterial wall, we evaluated the leukocyte-endothelium interactions in the three groups of subjects (controls and type 2 diabetic patients with and without nephropathy, according to the albumin/creatinin ratio). Type 2 diabetes was related to a decrease in the rolling velocity of polymorphonuclear leukocytes (PMN) that was more evident among patients with nephropathy (Fig. 3A;  $p < 0.01$  in patients without nephropathy and  $p < 0.001$  in those with nephropathy with respect to controls, and  $p < 0.05$  when non-nephropathic patients were compared with their nephropathic counterparts). A significant increase was observed in rolling flux (cells per minute), (Fig. 3B;  $p < 0.05$  in patients without nephropathy and  $p < 0.001$  in those with nephropathy with respect to the control group, and  $p < 0.001$  comparing non-nephropathic *vs.* nephropathic patients) and PMN adhesion (cells per square millimeter) (Fig. 3C;  $p < 0.05$  in patients without nephropathy and  $p < 0.01$  in those with nephropathy with respect to the control group, and  $p < 0.05$  when comparing non-nephropathic and nephropathic patients). These results suggest that type 2 diabetes is related with an increase in leukocyte-endothelium interactions that is more pronounced among patients with nephropathy than those who do not develop this complication (Fig. 3A–C).

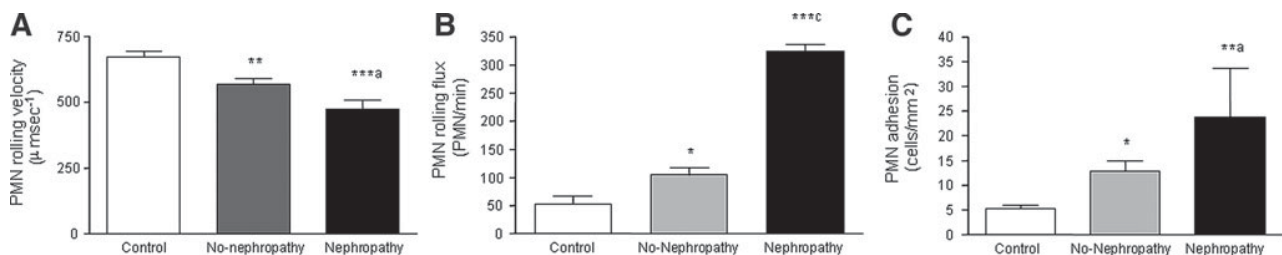
In addition, we explored a possible correlation between leukocyte-endothelial interactions and MPO levels in all our subjects and found that MPO levels were positively correlated with PMN rolling flux ( $r = 0.855$ ,  $p < 0.01$ ) and adhesion ( $r = 0.682$ ,  $p < 0.05$ ) (Table 2).

#### Levels of cytokines and adhesion molecules

Type 2 diabetes produced a significant increase in the levels of TNF $\alpha$  that was more evident in patients with nephropathy (Fig. 4A;  $p < 0.01$  without nephropathy and  $p < 0.001$  with nephropathy with respect to control subjects, and  $p < 0.001$  when comparing non-nephropathic *versus* nephropathic patients). Type 2 diabetic patients presented an increase in the adhesion molecules vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Fig. 4B;  $p < 0.05$  in both groups) and E-selectin (Fig. 4D;  $p < 0.05$  without nephropathy and  $p < 0.01$  with nephropathy with respect to controls and  $p < 0.05$  when comparing non-nephropathic *versus* nephropathic patients). Increased levels of the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  and adhesion molecules were related with type 2 diabetes, and the increase in these levels was higher among patients with nephropathy than those without nephropathy, with the exception of VCAM-1 ( $p < 0.05$ ).

Type 2 diabetes is associated with oxidative stress and microvascular dysfunction. Although endothelial dysfunction and endothelial/leukocyte interactions are key features of diabetes and are thought to be a major cause of diabetes-associated vascular complications, the underlying molecular mechanisms remain unclear.

It has been demonstrated that ROS play a key role in hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction and microvascular complications in type 2 diabetes (1). Our results confirm that type 2 diabetes is related to an increase in ROS



**FIG. 3.** Effects of type 2 diabetes on leukocyte-endothelium interactions. Effects of type 2 diabetes with and without nephropathy on (A) PMN rolling velocity (microsecond<sup>-1</sup>), (B) rolling flux (PMN per minute), and (C) PMN adhesion (PMN per square millimetre). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  *versus* Control. <sup>a</sup> $p < 0.05$  and <sup>c</sup> $p < 0.001$  corresponds with the differences between type 2 diabetic patients with nephropathy *versus* those without nephropathy.

TABLE 2. CORRELATION COEFFICIENT BETWEEN LEUKOCYTE-ENDOTHELIAL INTERACTIONS AND MPO LEVELS

	MPO (pM)	
	r	p-Value
Rolling velocity	-0.394	0.263
Rolling flux	0.855	0.004
Adhesion	0.682	0.030

Correlation coefficients were estimated by Spearman's correlation. We have studied the possible correlation between leukocyte-endothelial interactions and MPO levels in all subjects. We found that MPO levels were positively correlated with PMN rolling flux ( $r=0.855$ ,  $p<0.01$ ) and adhesion ( $r=0.682$ ,  $p<0.05$ ).

MPO, myeloperoxidase; PMN, polymorphonuclear leukocytes.

production in PMN, as demonstrated in a previous study (3). Levels of MPO were higher in the leukocytes of type 2 diabetic patients, and these increases seemed to be due to the presence of nephropathy. In these subgroups of patients, a positive correlation between levels of serum MPO and urinary albumin:creatinine ratio was apparent. MPO seems to play an important role in endothelial dysfunction. The activated leukocyte-derived hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), produced by the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase) is acutely released in respiratory bursts and disappears quickly. In contrast, activated leukocyte-released MPO binds to the vascular wall for a considerable time, sometimes for several days releasing ROS continuously.

Few studies have focused specifically on the relation between MPO levels and the presence of type 2 diabetes. Some clinical studies have reported significantly higher MPO levels in diabetics, whereas others have found no correlation, and lower levels in some cases (6). Such discrepancies may be explained; at least, in part, by differences in methodology, tissues analyzed, and study populations that hamper the interpretation of data. Regarding the possible mechanisms linking MPO and type 2 diabetes, it has been speculated that high MPO activity in diabetes is related to hyperinsulinemia, as the number of adhered neutrophils (evaluated based on MPO activity *in vitro*) rose when patients were administered

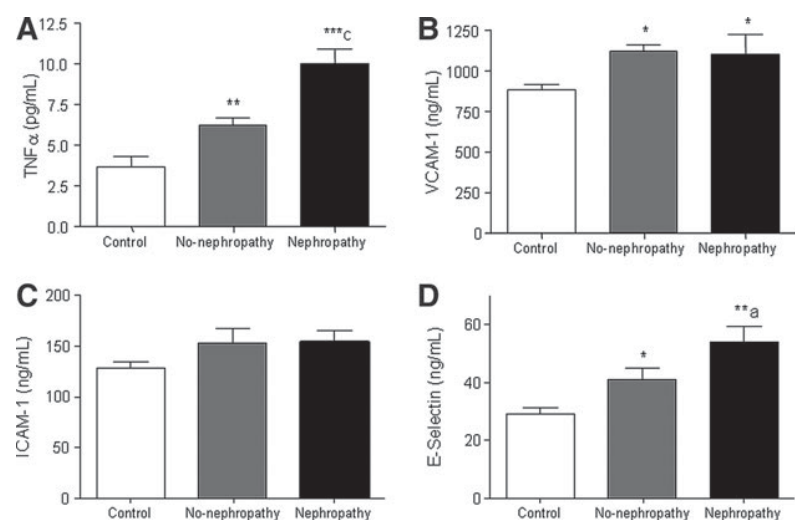
insulin. It has also been proposed that vascular-bound MPO uses high glucose-stimulated  $H_2O_2$  to induce glucose-induced injury to the vascular wall. The findings in our study are in accordance with reports demonstrating higher levels of MPO in diabetic patients.

Pathophysiological states, such as atherosclerosis and hypertension are characterized by leukocyte recruitment to the arterial wall. To study this process, we have used an *in vitro* model in which human leukocytes flow over a monolayer of human endothelial cells with a shear stress similar to that observed *in vivo* (7). This reproduces the process that precedes inflammation *in vivo* (rolling and adhesion) and which is critical to homeostasis and vascular cell integrity. If these interactions are exacerbated, the vascular dysfunction and injury associated with many CVDs can occur.

Type 2 diabetes can induce leukocyte-endothelium interactions and an increase in proinflammatory cytokines and adhesion molecules (4). We have observed that the inflammatory state in type 2 diabetic patients undermines PMN rolling velocity and enhances rolling flux and adhesion, thereby inducing leukocyte-endothelium interactions, and that there is a simultaneous increase in the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  and the adhesion molecules VCAM-1 and E-selectin. In type 2 diabetic patients with nephropathy, levels of proinflammatory cytokine TNF $\alpha$ , E-selectin and the induction of leukocyte-endothelium interactions are exacerbated. In this context, the function and number of endothelial progenitor cells, the maintenance of vascular homeostasis, and endothelium repair have all been proposed as pathogenic mechanisms of vascular disease in diabetes, thereby highlighting the important link between endothelial function and diabetic nephropathy.

Furthermore, we found a positive correlation between MPO levels and leukocyte-endothelium interactions, especially at the levels of rolling flux and adhesion. These results suggest that the aggravated inflammatory state underlying nephropathy could lead to an increase in the production of MPO by leukocytes that would enhance leukocyte-endothelium interactions, as the MPO molecule is thought to be capable of attracting leukocytes to the vascular wall *via* its electrostatic characteristics.

FIG. 4. Cytokines and adhesion molecules in the serum of type 2 diabetic patients with nephropathy and control subjects. (A) TNF $\alpha$ , (B) VCAM-1, (C) ICAM-1, and (D) E-selectin. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  with respect to control group; <sup>a</sup> $p<0.05$ , <sup>c</sup> $p<0.001$  when comparing non-nephropathic *versus* nephropathic patients using one way ANOVA with *post hoc* Student-Newman-Keuls test. ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.



In conclusion, we demonstrate an increase in the rate of ROS in diabetic patients and elevated concentrations of MPO in type 2 diabetes patients in general and, particularly, in those with nephropathy. In addition, MPO levels correlate positively with the albumin:creatinine ratio. Inflammation in type 2 diabetes induces leukocyte-endothelium interactions with a simultaneous increase in TNF $\alpha$  and the adhesion molecules VCAM-1 and E-selectin, and these conditions are aggravated by the presence of diabetic nephropathy.

Given that ROS and MPO are enhanced in type 2 diabetic patients and that MPO levels are specifically correlated with diabetic nephropathy, MPO/ROS may represent an important pathway underlying microvascular complications in type 2 diabetes, such as nephropathy.

## Notes

### Materials and Methods

#### Subjects

Our study population consisted of 203 patients (age  $53.4 \pm 6.7$ ) consecutively diagnosed with type 2 diabetes at the Endocrinology Outpatient's Department of the University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain) according to criteria of the American Diabetes Association. Diagnosis was confirmed when a patient fulfilled one or more of the following criteria: (i) levels of fasting serum glucose  $\geq 7.0$  mM (126 mg/dl) or random serum glucose  $\geq 11.1$  mM (200 mg/dl) on at least two occasions; (ii) HbA1c  $\geq 6.5\%$ ; or (iii) antidiabetic medication. Patients taking allopurinol or any oral antioxidant supplements were excluded from the study.

Control subjects ( $50.1 \pm 7.6$ ) were enrolled in the study after confirming that they did not fulfill any of the following criteria: (i) levels of fasting serum glucose  $\geq 7.0$  mM (126 mg/dl) or random serum glucose  $\geq 11.1$  mM (200 mg/dl) on at least two occasions; (ii) HbA1c  $\geq 6.5\%$ ; or (iii) antidiabetic medication. An additional inclusion criterion was the absence of any documented history of vascular disease (ischemic cardiopathy, peripheral arteriopathy, or cerebrovascular accident) and diabetes. Exclusion criteria were physical disability or alterations in the electrocardiogram, or clinical signs of coronary artery, peripheral, or cerebrovascular disease. None of the controls had nephropathy.

In accordance with the Declaration of Helsinki, all participants were informed of the purpose, procedures, risks, and possible benefits of the study and gave their express consent to take part. Approval was obtained from the hospital's ethics committee.

During a patient's first visit, his/her medical history was taken (including current treatment) and a physical examination was conducted to record his/her weight, height, and body mass index.

#### Evaluation of nephropathy

Diabetic nephropathy was confirmed when the urinary albumin:creatinine ratio was  $\geq 30$  mg/g. Albumin was determined in a 24-h urine sample by means of immunoturbidimetry.

#### Biochemical parameters

Patients were given an appointment to attend the Endocrinology Service Functional Test Unit a week later

(between 8:00–10:00 am) to have blood taken for clinical chemistry tests, and were given instructions to fast for at least 10 h beforehand. Blood samples were stored in SST tubes and immediately centrifuged for 10 min at 2000 g at 4°C. Serum aliquots were obtained on the same day as extraction to measure glucose and HbA1c. The intraserial coefficient of variation for this test was  $< 3.5$ .

#### Cells

PMNs were isolated from citrated blood samples and incubated with dextran (3%) for 45 min. The supernatant was obtained from the Fycoll-Hypaque gradient and centrifuged at 250 g for 25 min. The resulting pellet was then centrifuged at 100 g for 5 min at room temperature, and then resuspended in lysis buffer. PMNs were counted, washed in HBSS medium, and resuspended in complete RPMI medium.

#### Human umbilical vein endothelial cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were harvested from umbilical cords by means of treatment with collagenase (9). Passage 1 from primary cultures was employed in subsequent experiments. For adhesion studies, HUVEC were cultured on fibronectin (5 mg/ml)-coated 25-mm plastic coverslips until confluent ( $\sim 48$  h).

#### Measurement of ROS production

Total ROS production was evaluated in PMNs by two methods. Cells were incubated (30 min) with the fluorescent probe ( $5 \times 10^{-6}$  M) 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). First, ROS production was assessed by fluorimetry using a Synergy Mx plate reader (BioTek Instruments) and second, it was assessed using a fluorescence microscope (IX81; Olympus) coupled with the static cytometry software "ScanR" version 2.03.2 (Olympus). For static cytometry, PMNs from each subject were seeded in 48-well plates in triplicate and 16 images per well were recorded and analyzed.

#### MPO assay

Serum MPO concentrations were measured using an immunoassay based on a double-antibody "sandwich" technique according to the manufacturer's instructions (MPO EIA kit; Cayman Chemical). In brief, this assay provides a fluorescence-based method for detecting the MPO peroxidase activity in crude cell lysates. The assay utilizes the peroxidase component of MPO, and the reaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) produces the fluorescent compound resorufin.

#### Adhesion assay. Levels of cytokines and adhesion molecules

The parallel plate flow chamber *in vitro* model has been described in detail elsewhere (7). To perform adhesion assays, coverslips containing confluent HUVEC monolayers were inserted into a circular recess in the bottom plate of the flow chamber (maintained at 37°C), to which a  $5 \times 25$  mm portion of the endothelial cells were exposed. The chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S) connected to a video camera. Experiments were performed using a  $40 \times$  objective lens. PMNs were resuspended in

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline containing  $20 \times 10^{-3}$  M HEPES and 0.1% human serum albumin at  $1 \times 10^6$  cells/ml, and were drawn across the HUVEC monolayer at a controlled flow rate of 0.36 ml/min (estimated shear stress of  $0.7 \text{ dyne/cm}^2$ ). A circular glass window in the top plate of the chamber allowed real time microscopic examination of the monolayer exposed to the flow. Images in a single field of view were recorded over a 5-min period, which allowed leukocyte parameters to be determined. Leukocyte rolling was calculated by counting the number of leukocytes rolling over  $100 \mu\text{m}^2$  of the endothelial monolayer during a 1-min period. The velocity of 20 consecutive leukocytes in the field of focus was determined by measuring the time required to travel a distance of  $100 \mu\text{m}$ .

Adhesion was evaluated by counting the number of PMN that maintained stable contact with the HUVEC for 30 s. Tumoral necrosis factor (TNF $\alpha$ , 10 ng/ml, 4 h) and platelet activating factor (1  $\mu\text{M}$ , 1 h) were used as positive controls for HUVEC and leukocytes, respectively. A Luminex 100 flow analyzer system was employed to analyze VCAM-1, E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and TNF $\alpha$  in serum from controls and type 2 diabetic patients (Millipore).

#### Data analysis

Quantitative variables are expressed as mean and standard deviation if normally distributed and median and quartiles when otherwise. All statistical analyses were performed using Graph Pad Software. A Student's t test for unpaired samples was used to compare the means of normally distributed variables, while the Mann-Whitney U test was employed for variables without a normal distribution. A one-way ANOVA and *post hoc* Student-Newman-Keuls test were performed for multiple comparisons. Significance was defined as  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ . A correlation test was performed using the Pearson correlation coefficient ( $r$ ).

#### Acknowledgments

We thank B. Normanly for his editorial assistance (University of Valencia) and Isabel Soria for her work in the extraction of biological samples (University Hospital Dr. Peset). S.R., M.R., and R.F. researched data. V.M.V., C.P., A.A., A.J., and A.H. reviewed/edited the manuscript. A.H., M.R., and A.A. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. S.R. researched the data and contributed to the discussion. V.M.V and A.H. wrote the manuscript. A.H. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

This study was financed by grants PI10/1195, PI12/1984, SAF2010-16030, CIBERehd CB06/04/0071, PROMETEO 2010/060, ACOMP/2013/061, ACOMP/2012/042, and ACOMP/2012/045. 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 CP10/0360, respectively). C.d.P. was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación [FPI grant BES-2008-004338] and by Fundación Juan Esplugues. A.A. was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación [Ramón y Cajal program RYC2005-002295 and I3 program]. S.R. is recipient of a predoctoral fellowship from Carlos III Health Institute (FI11/00637).

#### References

1. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820, 2001.
2. Haraldsson B, Nystrom J, and Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88: 451–487, 2008.
3. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Apostolova N, Borrás C, Jover A, Bañuls C, Sola E, and Victor VM. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 50: 1215–1221, 2011.
4. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, de Pablo C, Alvarez A, Roldan-Rorres 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* 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.2337/dc12-1224.
5. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, and Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88: E14–E22, 2001.
6. Sato N, Kashima K, Tanaka Y, Shimizu H, and Mori M. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on generation of oxygen-derived free radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. *Diabetes* 46: 133–137, 1997.
7. Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, Gomez M, and Hernandez-Mijares A. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 3115–3122, 2011.
8. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, and Tataranni PA. 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, 2002.
9. Zhang C, Yang J, and Jennings LK. Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose—induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose—stimulated, vascular non—leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes* 53: 2950–2959, 2004.

Address correspondence to:  
Dr. Antonio Hernandez-Mijares  
Endocrinology Service  
University Hospital Doctor Peset  
Aida Gaspar Aguilar 90  
46017 Valencia  
Spain

E-mail: hernandez\_antmij@gva.es

Dr. Victor M. Victor  
Endocrinology Service  
University Hospital Doctor Peset  
Aida Gaspar Aguilar 90  
46017 Valencia  
Spain

E-mail: victor.victor@uv.es

Date of first submission to ARS Central, March 18, 2013; date of acceptance, March 24, 2013.

**Abbreviations Used**

CVD = cardiovascular disease  
DBP = diastolic blood pressure  
DCFH-DA = 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = hydrogen peroxide  
HbA1c = glycosylated haemoglobin  
HUVEC = human umbilical vein endothelial cells

ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1  
MPO = myeloperoxidase  
NADPH oxidase = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase  
PMN = polymorphonuclear leukocytes  
ROS = reactive oxygen species  
SBP = systolic blood pressure  
TNF $\alpha$  = tumour necrosis factor alpha  
VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule-1







## NEWS &amp; VIEWS

## Is Glycemic Control Modulating Endoplasmic Reticulum Stress in Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients?

Susana Rovira-Llopis,<sup>1-3,\*</sup> Celia Bañuls,<sup>1-3,\*</sup> Nadezda Apostolova,<sup>4,5</sup> Carlos Morillas,<sup>1-3</sup> Antonio Hernandez-Mijares,<sup>1-3,6</sup> Milagros Rocha,<sup>1-3</sup> and Victor M. Victor<sup>1-3,7</sup>

### Abstract

Oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stress is related to type 2 diabetes (T2D), but the influence of glycemic control on these parameters and its relationship with leukocyte-endothelial interactions is not known. In our study population consisting of 164 diabetic patients, (102 with glycated hemoglobin [HbA1c] <7% and 62 with HbA1c >7%) and 84 nondiabetic controls, we have verified a common anthropometric and metabolic pattern of T2D with dyslipidemia. Inflammatory parameters (high-sensitive C-reactive protein [hs-CRP] and tumor necrosis factor alpha [TNF $\alpha$ ]) and E-selectin levels were enhanced in the HbA1c >7% group with regard to controls. O<sub>2</sub> consumption and mitochondrial membrane potential were lower in diabetic patients than in controls. Reactive oxygen species (ROS) production was enhanced in diabetic patients than in controls and positively correlated with HbA1c levels. GRP78 levels were higher in both diabetic groups. However, HbA1c <7% patients displayed higher levels of spliced X-box binding protein 1 (*sXBP1*), whereas HbA1c >7% patients exhibited preferentially enhanced levels of CHOP (CCAAT/enhancer binding protein [C/EBP] homologous protein) and activating transcription factor 6 (ATF6). Reduced leukocyte rolling velocity and increased rolling flux and adhesion were observed in diabetic patients. Our findings lead to the hypothesis of an association between poor glycemic control in T2D and increased leukocyte ROS production and chronic ER stress that could finally promote leukocyte-endothelial interactions, which, in turn, poses a risk of vascular complications for these patients. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1759–1765.

### Introduction

OPTIMAL GLYCEMIC CONTROL IS crucial in clinical care of diabetic patients, as vascular complications of type 2 diabetes (T2D) are closely linked to glycemic exposure (9). Inflammation plays a role in each state of the atherogenic process, which starts when leukocytes roll along and then adhere to the endothelial surface, and culminates in their migration to other tissues. In addition to the main role that adhesion molecules play in this process, oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been related to enhanced leukocyte-endothelial interactions, vascular complications,

and the onset of cardiovascular diseases (CVD) (1). However, a full understanding of the underlying molecular processes of leukocytes that can lead to an increased risk of CVD in T2D is yet to be achieved.

Endoplasmic reticulum (ER) stress is a phenomenon that occurs in many pathological situations in which unfolded proteins accumulate in the ER and trigger activation of the unfolded protein response (UPR), which is orchestrated through several branches headed by inositol requiring enzyme 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6), and double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK). Several key elements are activated during UPR: 78-kDa glucose-regulated

<sup>1</sup>Foundation for the Promotion of Healthcare and Biomedical Research in the Valencian Community (FISABIO), Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Service of Endocrinology, University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain.

<sup>3</sup>Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain.

<sup>4</sup>Faculty of Health Sciences, University Jaume I, Castellón de la Plana, Spain.

<sup>5</sup>Department of Pharmacology and CIBER CB06/04/0071 Research Group, CIBER Hepatic and Digestive Diseases, University of Valencia, Valencia, Spain.

Departments of <sup>6</sup>Medicine and <sup>7</sup>Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

\*These authors contributed equally to this study.

**Innovation**

Endoplasmic reticulum (ER) stress has been related to the pathophysiology of type 2 diabetes (T2D); however, there are no studies evaluating its relationship with glycemic control and endothelial function.

Our results suggest that an adaptive ER stress response occurs in leukocytes of well-controlled patients, whereas a chronic response is present in poorly controlled patients, along with increased oxidative stress and impaired endothelial function. These findings highlight the potential implication of oxidative and ER stress in the development of vascular complications of T2D. A fuller understanding of these pathophysiological processes will, no doubt, aid the development of targeted therapies for patients with a high risk of cardiovascular diseases.

protein (GRP78), X-box binding protein 1 (XBP1), and ATF6 promote an increase in the folding capacity of the ER and induce the degradation of misfolded proteins; whereas CHOP (CCAAT/enhancer binding protein [C/EBP] homologous protein), a pro-apoptotic factor, is induced under chronic stress

conditions (5). Growing evidence indicates that inflammation signaling pathways and UPR converge at different stages and that oxidative stress is closely and bidirectionally related to ER stress (3).

Despite all of this evidence, how the pattern of expression of ER stress markers in peripheral blood cells is determined by the metabolic status of diabetic patients is a subject that requires further investigation. In addition, it remains to be confirmed whether ER stress is related to the interaction of leukocytes with the endothelium and subsequent risk of CVD. Therefore, our aim was to assess oxidative and ER stress markers in leukocytes from well *versus* poorly controlled T2D patients and to confirm a potential relationship with endothelial function.

**Metabolic and Clinical Characteristics**

Both T2D patient groups had significantly higher weight, body mass index (BMI), waist circumference, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure than controls ( $p < 0.05$ ) (Table 1). In terms of biochemical parameters, glucose, insulin and homeostasis model assessment of insulin resistance

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC, METABOLIC, AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF TYPE 2 DIABETES PATIENTS (SEPARATED ACCORDING TO HbA1c LEVELS) AND CONTROL SUBJECTS

	Control	Type 2 diabetes	
		HbA1c < 7%	HbA1c > 7%
n (male%)	84 (42.9)	102 (51.0)	62 (56.4)
Age (years)	57.0 ± 8.9	59.8 ± 7.5	61.1 ± 7.2
Weight (kg)	73.9 ± 12.7	81.3 ± 15.6 <sup>a</sup>	83.6 ± 14.3 <sup>a</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.4 ± 4.1	31.4 ± 4.9 <sup>b</sup>	31.4 ± 4.8 <sup>b</sup>
Waist (cm)	92.5 ± 14.1	105.4 ± 12.1 <sup>b</sup>	107.6 ± 9.7 <sup>b</sup>
Hip (cm)	105.7 ± 8.7	110.0 ± 11.0	107.9 ± 8.8
WHR	0.87 ± 0.10	0.96 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.05 <sup>b</sup>
SBP (mmHg)	131.3 ± 17.6	141.3 ± 17.0 <sup>a</sup>	140.7 ± 14.7 <sup>c</sup>
DBP (mmHg)	76.8 ± 8.3	84.0 ± 17.0 <sup>a</sup>	83.6 ± 8.3 <sup>c</sup>
Glucose (mg/dl)	93.9 ± 11.2	118.6 ± 24.9 <sup>b</sup>	165.2 ± 59.6 <sup>b,d</sup>
Insulin (μU/ml)	9.79 ± 4.46	12.10 ± 5.98 <sup>c</sup>	12.05 ± 6.23 <sup>c</sup>
HOMA-IR	2.30 ± 1.18	3.87 ± 2.40 <sup>b</sup>	5.16 ± 3.32 <sup>b,e</sup>
HbA1c (%)	5.32 ± 0.31	6.07 ± 0.39 <sup>b</sup>	7.80 ± 0.90 <sup>b,d</sup>
Total cholesterol (mg/dL)	208.1 ± 33.9	178.2 ± 36.8 <sup>b</sup>	169.5 ± 34.7 <sup>b</sup>
HDL-c (mg/dl)	51.5 ± 10.9	47.1 ± 11.6 <sup>a</sup>	44.5 ± 10.5 <sup>b</sup>
LDL-c (mg/dl)	135.1 ± 30.9	107.2 ± 30.7 <sup>b</sup>	97.9 ± 27.1 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg/dl)	94.0 (69.5; 123.0)	116.0 (85.8; 164.5) <sup>a</sup>	112.0 (91.0; 171.5) <sup>a</sup>
hs-CRP (mg/L)	2.56 ± 2.33	3.49 ± 2.91	4.30 ± 3.37 <sup>c</sup>
TNFα (pg/ml)	4.98 ± 3.22	5.55 ± 2.44	6.51 ± 2.91 <sup>c</sup>
E-selectin (ng/ml)	28.6 ± 10.3	31.2 ± 14.8	39.1 ± 21.6 <sup>c</sup>
Treatment (%)			
Oral anti-diabetic drugs	—	91.4	86.0
Metformin	—	90.0	82.0
DPP4 inhibitors	—	37.1	48.0
Sulphonylurea	—	3.8	10.4
Glitazone	—	13.2	6.0
Anti-hypertensive drugs	21.7	67.1 <sup>b</sup>	60.0 <sup>b</sup>
Statins	15.2	71.4 <sup>b</sup>	78.0 <sup>b</sup>

Parametric data are expressed as mean ± SD, and nonparametric data are expressed as median (25th percentile; 75th percentile). One-way analysis of variance for parametric data or Kruskal–Wallis test for nonparametric data were employed to compare groups, followed by Student–Newman–Keuls or Dunn's *post-hoc* test, respectively. Chi-square was used to compare proportions.

<sup>c</sup> $p < 0.05$ , <sup>a</sup> $p < 0.01$ , and <sup>b</sup> $p < 0.001$  when comparing with the control group, <sup>e</sup> $p < 0.05$ , <sup>d</sup> $p < 0.001$  when comparing patients with HbA1c < 7% versus those with HbA1c > 7%.

BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HbA1c, glycated hemoglobin or hemoglobin A1c; 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; SBP, systolic blood pressure; TNFα, tumor necrosis factor alpha; WHR, waist-to-hip ratio.

(HOMA-IR) were increased in T2D patients with regard to the control group ( $p < 0.001$ ), with differences being more pronounced in patients with poor glycemic control in the case of glucose and HOMA-IR. Fasting levels of triglycerides were higher and HDL-c levels were lower among T2D patients ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ). However, total cholesterol and LDL-c levels were significantly lower in T2D patients ( $p < 0.001$ ) than in controls, which was associated with a higher frequency of statin treatment ( $p < 0.001$ ). In addition, patients with HbA1c  $> 7\%$  displayed higher levels of high-sensitive C-reactive protein (hs-PCR) ( $p < 0.05$ ) and TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), indicating an underlying inflammatory state. Levels of the adhesion molecule E-selectin were also higher in the HbA1c  $> 7\%$  group ( $p < 0.05$  vs. controls). No differences were detected between diabetic patient groups with regard to medical treatment.

### Oxidative Stress Parameters

A lower leukocyte O<sub>2</sub> consumption rate and  $\Delta\Psi_m$  were detected in T2D patients (Fig. 1A, B;  $p < 0.001$  with regard to controls). Furthermore, an increase in total reactive oxygen species (ROS) production was observed in T2D patients, and was particularly pronounced among those with HbA1c levels  $> 7\%$  (Fig. 1C). In addition, total ROS production correlated positively with HbA1c levels ( $r = 0.208$ ,  $p < 0.05$ ). Similar results were obtained when mitochondrial ROS production was determined (Fig. 1D). Accordingly, a positive correlation between mitochondrial ROS and HbA1c was observed ( $r = 0.375$ ,  $p < 0.01$ ).

### ER Stress Markers

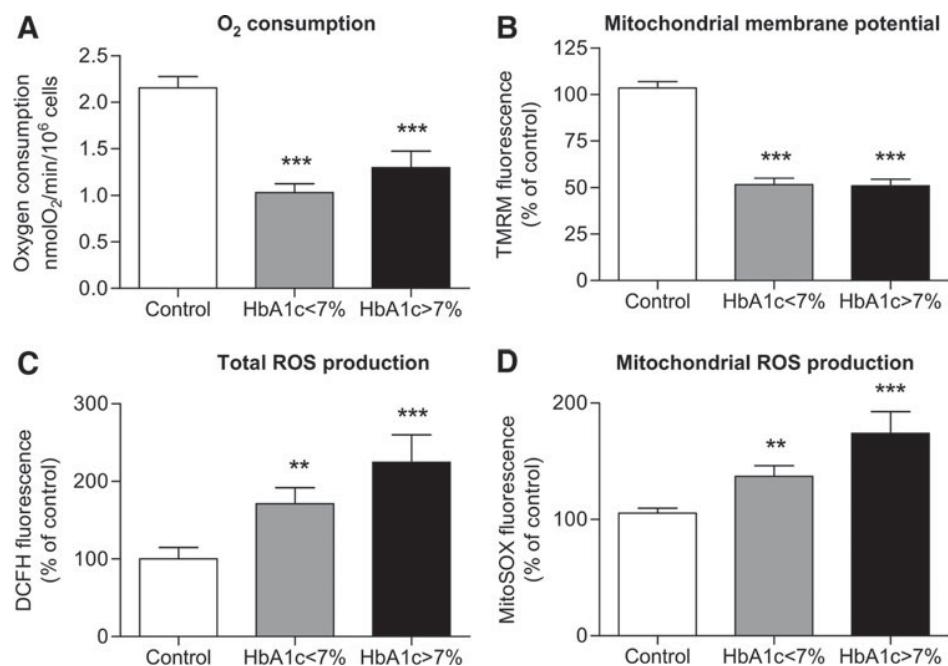
We evaluated mRNA expression in leukocytes of *GRP78*, an initiator of the UPR; spliced X-box binding protein 1 (*sXBP1*), an UPR intermediary; and *CHOP*, a proapoptotic mediator. *GRP78* expression was upregulated in both groups

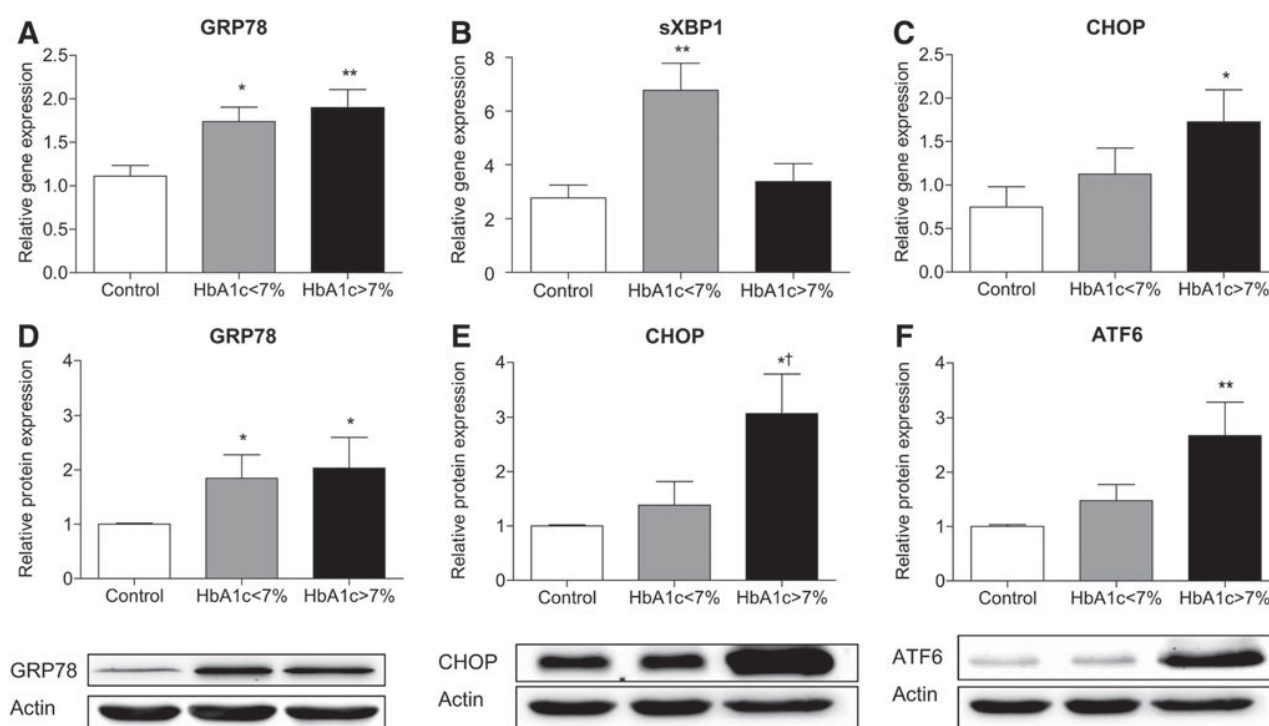
of T2D patients (Fig. 2A), and more significantly among those with poor glycemic control. *sXBP1* levels were higher in the HbA1c  $< 7\%$  group only (Fig. 2B,  $p < 0.01$ ), suggesting an initial rescue response in these patients. In contrast, *CHOP* expression was upregulated only in the poor glycemic control group (Fig. 2C;  $p < 0.05$ ), indicating a pro-apoptotic status of the cells subjected to chronic stress. To confirm the presence of ER stress and in order to assess whether the activation of the UPR was branch specific, we assessed protein levels of GRP78, CHOP, and ATF6, an intermediary of a different UPR branch. GRP78 protein levels were higher in both diabetic groups (Fig. 2D;  $p < 0.05$ ), whereas the expression of CHOP and ATF6 was enhanced only in the poor glycemic control group (Fig. 2E, F, respectively). This suggests that, in addition to a pro-apoptotic state of the cells of these patients, the ATF6 branch of the UPR is specifically activated in this dysglycemic condition. Thapsigargin-treated human U937 leukocytes ( $2 \mu\text{M}$ , 24 h) were employed as a positive control for both mRNA and protein expression studies (data not shown).

### Leukocyte-Endothelial Interactions

We aimed at elucidating whether the glycemic control status of T2D patients is related to endothelial function. Leukocyte rolling velocity was diminished in both diabetic groups independently of the glycemic control status of patients (Fig. 3A;  $p < 0.001$ ). Leukocyte rolling flux (Fig. 3B) was enhanced in T2D patients ( $p < 0.001$ ) and significantly more pronounced among patients with HbA1c levels  $> 7\%$  ( $p < 0.05$ ). Leukocyte adhesion to the endothelium was increased similarly in both diabetic groups with regard to the nondiabetic group (Fig. 3C;  $p < 0.001$ ). Interestingly, leukocyte rolling velocity was found to be negatively correlated with *GRP78* ( $r = -0.367$ ,  $p < 0.05$ ) and *sXBP1* ( $r = -0.444$ ,  $p < 0.05$ ) levels, whereas leukocyte adhesion was positively correlated with *CHOP* levels ( $r = 0.589$ ,  $p < 0.001$ ).

**FIG. 1.** Effects of HbA1c levels on oxidative stress parameters in T2D patients categorized in two groups according to HbA1c levels ( $< 7\%$  and  $> 7\%$ ) and control subjects. (A) O<sub>2</sub> consumption rate ( $n = 30$  per group). (B) Mitochondrial membrane potential ( $n_{\text{controls}} = 29$ ,  $n_{\text{HbA1c} < 7\%} = 41$ , and  $n_{\text{HbA1c} > 7\%} = 36$ ). (C) Total ROS production ( $n_{\text{controls}} = 44$ ,  $n_{\text{HbA1c} < 7\%} = 35$ , and  $n_{\text{HbA1c} > 7\%} = 32$ ). (D) Mitochondrial ROS production ( $n_{\text{controls}} = 20$ ,  $n_{\text{HbA1c} < 7\%} = 27$ , and  $n_{\text{HbA1c} > 7\%} = 29$ ). \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  with regard to controls using one-way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post-hoc* test. ANOVA, analysis of variance; ROS, reactive oxygen species; T2D, type 2 diabetes.





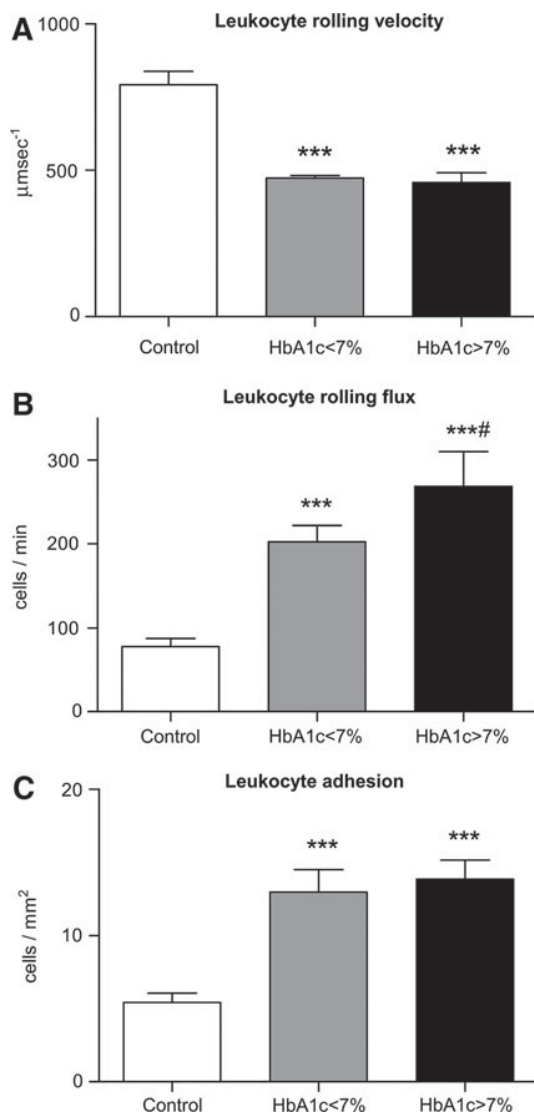
**FIG. 2.** Evaluation of the mRNA and protein expression of endoplasmic reticulum stress markers in T2D patients with varying levels of HbA1c and control subjects.  $n = 15$  subjects per group in mRNA studies and  $n = 10$  samples (pools) per group in protein studies. (A) mRNA relative expression of *GRP78*. (B) mRNA relative expression of *sXBP1*. (C) mRNA relative expression of *CHOP*. (D) Representative image of *GRP78* protein expression and densitometry quantification (*bar graph*). (E) Representative image of *CHOP* expression and densitometry quantification (*bar graph*). (F) Representative image of *ATF6* protein expression and densitometry quantification (*bar graph*). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  with regard to controls, † $p < 0.05$  comparing HbA1c <7% versus HbA1c >7% using one-way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post-hoc* test. ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, CCAAT/enhancer binding protein [C/EBP] homologous protein; GRP78, 78-kDa glucose-regulated protein; *sXBP1*, spliced X-box binding protein 1.

We have previously shown that leukocytes from T2D patients display features of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, and that these disturbances may be aggravated in the presence of diabetic vascular complications such as silent myocardial ischemia (2). Our findings indicate that mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and  $O_2$  consumption are significantly undermined in T2D regardless of the glycemic control status of the patient; whereas the enhancement of ROS production is more pronounced in patients whose glycemia is poorly controlled. Thus, oxidative stress, which is a common feature of T2D, increases in parallel with HbA1c levels, highlighting the importance of the relationship between glycemic control in T2D and ROS production.

Most research about T2D has focused on the way ER stress contributes to the development of insulin resistance and the disease itself (7). ER stress has been involved in pancreatic  $\beta$ -cell death in T2D patients (4). In addition, it has also been shown that ER stress is enhanced in the leukocytes of non-obese T2D patients, and is associated to increased apoptosis and impaired immune function in these cells (6). Another study performed by Sage and col. showed that *sXBP1*, *GRP78*, and *CHOP* levels in mononuclear cells of patients with metabolic syndrome correlated positively with glucose levels (8). Our data indicate that the pattern of expression of the ER stress markers *GRP78*, *sXBP1*, *CHOP*, and *ATF6* differs according to the glycemic control status of the patient.

In relation to UPR stage, T2D patients with a well-controlled glycemic state displayed an adaptive response to ER stress with increased levels of *GRP78* and higher levels of *sXBP1*, whose expression is known to be protective and which is involved in the restoration of cell homeostasis. In contrast, and in addition to high levels of *GRP78*, T2D patients with poor glycemic control had enhanced levels of *CHOP* and unaltered *sXBP1*, suggesting that cells avoid the restoration response in favor of promoting cell death in this worsened condition. Thus, our results suggest that an adaptive UPR mediated by *IRE1 $\alpha$*  pathway is activated in patients with good glycemic control and when cells are subjected to intense oxidative stress and chronic exposure to glucose, the response shifts to a pro-apoptotic programme along with a specific activation of *ATF6* branch. Addressing the precise mode of UPR activation in these different T2D populations is sure to increase our knowledge of the pathophysiological mechanisms of the disease and could have implications for the development of novel directed therapies.

Whether changes in intracellular signaling in leukocytes are related to the interaction of these cells with the endothelium and the subsequent risk of developing CVD remains to be confirmed. In this sense, these findings and those of previous studies show that enhanced ROS production in T2D patients is related to an increase in leukocyte-endothelial interactions (2). In addition, we show that endothelial function



**FIG. 3. Leukocyte-endothelial interactions in T2D patients with varying levels of HbA1c and control subjects.**  $n=15$  subjects per group. (A) Leukocyte rolling velocity, measured as the time required to travel a distance of  $100\ \mu\text{m}$  by 20 consecutive cells. (B) Leukocyte rolling flux, estimated as the number of leukocytes rolling over  $100\ \mu\text{m}^2$  of the endothelial monolayer during a 1-min period. (C) Leukocyte adhesion, determined by counting the number of leukocytes that maintained stable contact with the monolayer for 30 s. \*\*\* $p < 0.001$  with regard to controls, # $p < 0.05$  comparing HbA1c <7% versus HbA1c >7% using one-way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post-hoc* test.

is worsened in patients whose glycemia is poorly controlled. Surprisingly, we have noticed that ER stress could be involved in the induction of leukocyte-endothelial interactions, as *GRP78* and *sXBPI* levels correlate with decreased rolling velocity, indicative of the leukocytes starting to roll over the endothelium in well-controlled patients. In addition, the positive correlation between *CHOP* and leukocyte adhesion suggests that, under pro-apoptotic conditions derived from chronic activation of the UPR, leukocytes tend to adhere to

endothelial cells, which could contribute to the vascular complications of T2D, especially in patients with severe dysglycemia.

Overall, our findings provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms of the leukocytes of T2D patients, indicating that increased oxidative stress, along with ER stress, may contribute to the enhanced interaction between these cells and the endothelium, increasing the risk of CVD.

## Notes

### Subjects

The study population consisted of 164 patients with T2D attending the Endocrinology and Nutrition Service of the University Hospital Dr. Peset and 84 age- and sex-matched nondiabetic controls. The inclusion criteria for all subjects were BMI of  $20\text{--}40\ \text{kg/m}^2$ , clinically normal hematological profile, and absence of malignant neoplasm or any autoimmune disease. Patients were diagnosed with T2D according to the criteria established by the American Diabetes Association. Following its recommendations concerning the optimal HbA1c level for preventing macro- and microvascular complications—7% (53 mmol/mol)—patients were subdivided into two groups according to their HbA1c levels (set as the average of the last two measures): good glycemic control ( $n=102$ , HbA1c <7%) and poor glycemic control ( $n=62$ , HbA1c >7%). Those patients with high changes of HbA1c values in the last 6 months were excluded as well as those whose treatment included insulin or any antioxidant supplement.

During the first visit, the patient's medical history was taken (including current treatment) and a physical examination was conducted to record their weight, height, BMI, waist, and hip circumference. Blood pressure was measured twice consecutively using a sphygmomanometer.

The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all subjects gave their expressed written consent to take part in the study. Approval was obtained from the Hospital Doctor Peset ethics committee.

### Biochemical determinations

Blood samples were centrifuged at  $2000\ g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ , and serum was isolated to determine glucose, total cholesterol, and triglyceride levels using an enzymatic method and HDL-cholesterol levels using a direct method with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp.). LDL-cholesterol levels were calculated with Friedewald's formula. Insulin levels were determined by immunochemiluminescence in a DPC Immulite analyzer (Block Scientific Corporation). Insulin resistance was assessed using the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR = [fasting glucose in mg/dl  $\times$  fasting insulin in  $\mu\text{UI/ml}$ ]/405). HbA1c was determined with an Automatic Glycohemoglobin Analyzer (Arkray, Inc.). High-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels were quantified by immunonephelometry. Serum levels of the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  and the adhesion molecule E-selectin were assessed with a Luminex 200 flow analyzer system (Luminex Corporation).

### Leukocyte isolation

Leukocytes were isolated from citrated blood samples by density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque according to standard protocols.

### Measurement of O<sub>2</sub> consumption, mitochondrial membrane potential, total ROS, and mitochondrial ROS

Due to the number of leukocytes in patient samples being limited, which means that it is not always possible to perform such tests for each and every patient, leukocytes from the different groups were randomly assigned to at least one technique of this section.

To assess O<sub>2</sub> consumption, cells were resuspended ( $5 \times 10^6$  cells/ml) in Hanks' balanced salt solution and placed in a gas-tight chamber coupled to a Clark-type O<sub>2</sub> electrode (Rank Brothers). Sodium cyanide ( $10^{-3}$  M) was used to confirm whether O<sub>2</sub> consumption was mainly mitochondrial (95%–99%).

Tetramethylrhodamine methylester (TMRM;  $5 \times 10^6$   $\mu$ M) was used to estimate  $\Delta\Psi_m$ , 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA;  $5 \times 10^6$   $\mu$ M) to measure total ROS production and Mitosox ( $5 \times 10^6$   $\mu$ M) was used to detect mitochondrial ROS. Leukocytes were incubated for 30 min with the respective fluorescent probe, and fluorescence was measured using Fluoroskan (Thermo Labsystems, Thermo Scientific).

### Evaluation of ER stress pathways

mRNA expression. Total RNA was extracted from leukocytes using the GeneAid Ribospin™ Total RNA extraction kit (GeneAid Biotechnology) following the manufacturer's procedure, and the amount of RNA was quantified using Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). RNA purity was verified by an optical density absorption ratio of 260/280 nm between 1.8 and 2.0. First-strand cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of RNA using a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific), and 1  $\mu$ l of the cDNA obtained was employed in subsequent steps. *CHOP*, *GRP78*, and *sXBP1* expression was assessed by real-time PCR using SYBR green (Roche Applied Science) in a 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies). Primer sequences and protocol details are described in Table 2. GAPDH gene expression was used as an endogenous control. Relative quantification was performed according to the comparative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using expression suite software (Life Technologies). Human U937 leukocytic cell lines treated with the ER stress inducer thapsigargin (Sigma Aldrich) at 2  $\mu$ M for 24 h were used as positive controls.

Western blotting. Leukocytes from 5 to 10 patients were pooled according to group (control, HbA1c < 7% and HbA1c > 7%), and similarities between subjects regarding fasting glucose levels, HbA1c, age, and BMI were noted. Total protein extracts from leukocyte pools were obtained after lysing with an extraction buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.1 mM EDTA, 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, and 0.5% NP-40) containing protease inhibitors (10 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM PNP, and 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate) and dithiothreitol 1 mM after incubation for 15 min on ice and centrifugation at 4°C for 15 min. The isolated supernatant containing protein extract was quantified

TABLE 2. SEQUENCES OF THE PRIMERS USED AND DETAILS OF REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION PROTOCOL

Primers				
Target	Direction	Sequence (5'–3')		
CHOP	Forward	AGAACCAGGAAACGGAAACAGA		
	Reverse	TCTCCTTCATGCGTGCTTT		
GRP78	Forward	AAGAACCAGCTCACCTCCAACCC		
	Reverse	TTCAACCACCTTGAACGGCAA		
sXBP1	Forward	CTGAGTCCGCAGCAGGTG		
	Reverse	AACAGGATATCAGACTCTGAATCTGAA		
GAPDH	Forward	CGCATCTTCTTTTGCCTCG		
	Reverse	TTGAGGTCAATGAAGGGGTCA		
Protocol				
Temperature	95°C	95°C	60°C	Melting
Time	10 min	10 s	30 s	curve
No. of cycles	1		40	

using the BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Twenty-five micrograms of protein were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, then transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with anti-CHOP mouse monoclonal antibody (Thermo Scientific), anti-GRP78 rabbit polyclonal antibody (Abcam), anti-ATF6 mouse monoclonal antibody (which detects the cleaved/active form of ATF6; Thermo Scientific), and anti-actin rabbit polyclonal antibody (Sigma Aldrich). HRP-goat anti-mouse (Thermo Scientific) and peroxidase goat anti-rabbit (Vector Laboratories) were used as secondary antibodies. The protein signal was detected by chemiluminescence, after incubating membranes with ECL plus reagent (GE healthcare) or Supersignal West Femto (Thermo Scientific), and was visualized in a Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat). Images were analyzed by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat). Thapsigargin-treated U937-cell line human leukocytes (2  $\mu$ M, 24 h) were employed as positive controls.

### Adhesion assay

The human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) used in the adhesion studies were harvested from umbilical cords by means of treatment with collagenase. In subsequent experiments, passage 1 from primary cultures was employed. HUVEC were cultured on fibronectin (5 mg/ml)-coated 25-mm plastic coverslips until they were confluent ( $\approx$  48 h). For the parallel plate flow chamber *in vitro* model study, human leukocytes were resuspended in Dulbecco's PBS containing  $20 \times 10^{-3}$  M HEPES and 0.1% human serum albumin at  $1 \times 10^6$  cells/ml and drawn across the HUVEC monolayer at a controlled flow rate of 0.36 ml/min (estimated shear stress of 0.7 dyne/cm<sup>2</sup>) under an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S) connected to a video camera (Sony Exware HAD). Images in a single field of view were recorded over a 5-min period during which leukocyte parameters were determined. The rolling velocity in the field of focus was determined by measuring the time required by 20 consecutive leukocytes to cover a distance of 100  $\mu$ m. Leukocyte rolling was estimated as the number of leukocytes rolling over 100  $\mu$ m<sup>2</sup> of the endothelial monolayer during a 1-min period. Adhesion was determined by counting the number of leukocytes that maintained

stable contact with the monolayer for 30 s. TNF $\alpha$  (10 ng/ml, 4 h) and platelet-activating factor (1  $\mu$ M, 1 h) were used as positive controls for HUVEC and leukocytes, respectively.

#### Statistical analysis

Data analysis was performed with SPSS 17.0. Values in Table 1 are expressed as mean  $\pm$  SD for parametric data and as median (25th and 75th percentiles) for nonparametric data. Bar graphs show mean  $\pm$  SE. The three groups were compared with one-way analysis of variance (and Student–Newman–Keuls *post-hoc* test) or Kruskal–Wallis (and Dunn’s multiple-comparison *post-hoc* test) for parametric and nonparametric data, respectively. Chi-square was employed to compare proportions. Correlations were calculated using Pearson’s correlation coefficient. Significant differences were considered when  $p < 0.05$ .

#### Acknowledgments

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia) for his editorial assistance, Isabel Soria (University Hospital Dr. Peset) for her work in the extraction of biological samples, and Rosa Falcon and Raquel Castello (FISABIO) for their technical assistance.

This study was financed by grants PI12/1984, PI13/1025, PI13/0073, CIBERehd CB06/04/0071, PROMETEO 2010/060, and the European Regional Development Fund (ERDF). 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 CP10/0360, respectively). S.R. is recipient of a predoctoral fellowship from Carlos III Health Institute (FI11/00637).

#### References

- Ballinger SW. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 38: 1278–1295, 2005.
- Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, de Pablo C, Alvarez A, Roldan-Torres I, Solaz-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.
- Higa A and Chevet E. Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cell Signal* 24: 1548–1555, 2012.
- Huang CJ, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Wu X, Soeller WC, and Butler PC. Induction of endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1656–E1662, 2007.
- Hummasti S and Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 107: 579–591, 2010.
- Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, and Kaneko S. CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59: 634–643, 2010.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, and Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306: 457–461, 2004.
- Sage AT, Holtby-Ottenhof S, Shi Y, Damjanovic S, Sharma AM, and Werstuck GH. Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)* 20: 748–755, 2012.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837–853, 1998.

Address correspondence to:

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

E-mail: victor.victor@uv.es

Dr. Milagros Rocha  
Foundation for the Promotion of Healthcare  
and Biomedical Research in the Valencian  
Community (FISABIO)  
University Hospital Doctor Peset  
Avda Gaspar Aguilar 90  
46017 Valencia  
Spain

E-mail: milagros.rocha@uv.es

Date of first submission to ARS Central, June 27, 2014; date of acceptance, July 7, 2014.

#### Abbreviations Used

$\Delta\Psi_m$	= mitochondrial membrane potential
ATF6	= activating transcription factor 6
BMI	= body mass index
CHOP	= CCAAT/enhancer binding protein [C/EBP] homologous protein
CVD	= cardiovascular disease
DBP	= diastolic blood pressure
DCFH-DA	= 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
ER	= endoplasmic reticulum
GRP78	= 78-kDa glucose-regulated protein
HbA1c	= glycated hemoglobin or hemoglobin A1c
HDL-c	= high-density lipoprotein cholesterol
HOMA-IR	= homeostasis model assessment of insulin resistance
hs-CRP	= high-sensitive c-reactive protein
HUVEC	= human umbilical vein endothelial cells
IRE1	= inositol requiring enzyme 1
LDL-c	= low-density lipoprotein cholesterol
PERK	= double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase
ROS	= reactive oxygen species
SBP	= systolic blood pressure
sXBP1	= spliced X-box binding protein 1
T2D	= type 2 diabetes
TMRM	= tetramethylrhodamine methylester
TNF $\alpha$	= tumor necrosis factor alpha
UPR	= unfolded protein response





## NEWS & VIEWS

# Is Autophagy Altered in the Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients?

Susana Rovira-Llopis,<sup>1,2</sup> Noelia Díaz-Morales,<sup>1</sup> Celia Bañuls,<sup>1,2</sup> Ana Blas-García,<sup>1,3</sup> Miriam Polo,<sup>1,3</sup> Sandra López-Domenech,<sup>1</sup> Ana Jover,<sup>1</sup> Milagros Rocha,<sup>1-3</sup> Antonio Hernández-Mijares,<sup>1,2,4</sup> and Víctor M. Víctor<sup>1-3,5</sup>

### Abstract

It is unknown whether autophagy is altered in the leukocytes of type 2 diabetes (T2D) patients and whether oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stresses regulate this mechanism. We studied anthropometric and metabolic parameters and evaluated oxidative stress, chromatin condensation, ER stress, and autophagy parameters in leukocytes of 103 T2D patients *versus* 109 sex- and age-matched controls. Patients showed increases in glucose, insulin, homeostasis model assessment of insulin resistance, and glycated hemoglobin (HbA1c) compared with controls ( $p < 0.001$ ). Leukocytes displayed enhanced total and mitochondrial reactive oxygen species (ROS), reduced mitochondrial mass, and increased chromatin condensation ( $p < 0.05$ ). ER stress was also activated in diabetic patients, who displayed augmented glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha (P-eIF2 $\alpha$ ), and activating transcription factor 6 (ATF6) levels ( $p < 0.05$ ). We also observed an increase in the autophagy markers, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II and Beclin 1 ( $p < 0.05$ ), and significant positive correlations between Beclin 1 and total ROS ( $r = 0.667$ ), GRP78 ( $r = 0.925$ ) and P-eIF2 $\alpha$  ( $r = 0.644$ ), and between LC3-II and P-eIF2 $\alpha$  ( $r = 0.636$ ) and ATF6 ( $r = 0.601$ ). Our results lead to the hypothesis that autophagy is activated in the leukocytes of T2D patients and that both oxidative and ER stress signaling pathways may be implicated in the induction of autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

### Introduction

**T**YPE 2 DIABETES (T2D) has become a major health concern due to its increasing incidence rates, especially in developing countries. The onset of T2D is linked to obesity and insulin resistance, although the key mechanism by which insulin resistance in obesity leads to T2D is not fully understood. Nevertheless, inflammation and the infiltration of immune cells into pancreatic islets seem to be implicated.

The underlying chronic inflammatory state is a hallmark of T2D, and inflammatory cells such as leukocytes are vulnerable and markedly affected by hyperglycemia. In fact, these alterations may, in part, contribute to the increased susceptibility of T2D patients to infection as their innate immune

defenses are compromised (1). In previous studies, we have described how leukocytes from T2D patients are impaired and show features of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum (ER) stress, which are aggravated in the presence of macrovascular complications such as silent myocardial ischemia and modulated by glycemic control (5, 8).

Several molecular mechanisms are involved in the etiology and progression of T2D and its complications, with hyperglycemia-induced oxidative stress being the most studied and characterized, followed by ER stress and its cellular stress response, the unfolded protein response (UPR), which is an important contributing mechanism to T2D pathophysiology. A growing body of research has highlighted a

<sup>1</sup>Service of Endocrinology, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), University Hospital Doctor Peset, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain.

<sup>3</sup>CIBERehd—Department of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

Departments of <sup>4</sup>Medicine and <sup>5</sup>Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

**Innovation**

Autophagy is involved in the pathophysiology of type 2 diabetes (T2D), but its regulation in the leukocytes of diabetic patients is unclear. Our findings, obtained from a large cohort of T2D patients, suggest that autophagy is enhanced in the leukocytes of these subjects, as are oxidative and endoplasmic reticulum stresses. Given that leukocytes play a central role in immunity and contribute to the inflammatory state observed in T2D, these results broaden our knowledge of the pathophysiological mechanisms that influence the impaired immune function present in diabetic patients. Whether autophagy can be restored and how it may improve leukocyte function are questions that need to be addressed by future research.

role for oxidative and ER stress-dependent activation of autophagy in the cellular changes associated with diabetes (2, 9). Autophagy is the process of degradation of cellular components within membrane vesicles known as autophagosomes, which represents a recycling of the breakdown products. Two important proteins that participate in autophagy are the microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) and Beclin 1. When the process of autophagy begins, LC3-I (cytoplasmic

form) is lipidated to LC3-II and recruited to autophagosomal membranes. Beclin 1 participates in autophagosome formation, mediating the recruitment of several autophagy proteins to the preautophagosomal membrane (3). Although autophagy plays an important role in the maintenance of normal function and survival of cells, if it is excessive, it can lead to cell death (2).

Modulation of autophagy in diabetes varies depending on cell type. Whereas autophagy is activated in pancreatic  $\beta$ -cells due to peripheral insulin resistance and maintains normal  $\beta$ -cell function and adequate glucose-stimulated insulin secretion, the autophagic machinery is inhibited in the liver of T2D mice with insulin resistance.

Whether the process of autophagy in leukocytes is altered in T2D is a question that has not yet been addressed. In the present study, we aimed to assess autophagy activation in leukocytes from T2D patients compared with control subjects and to explore how oxidative and ER stresses are associated with this process.

**Clinical and Metabolic Parameters**

Our study assessed 103 T2D patients and 109 age- and sex-matched control subjects. Patient characteristics and treatments are summarized in Table 1. Diabetic patients had a

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION

	Control	T2D	p-Value	BMI-adjusted p-value
N	109	103	—	
Male%	46.8	54.4	0.270	
Age (years)	59.5 ± 7.2	59.7 ± 6.6	0.873	
Weight (kg)	69.7 ± 11.6	85.5 ± 17.8	<0.001	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.3 ± 3.6	31.5 ± 5.5	<0.001	
Waist (cm)	89.7 ± 13.2	106.0 ± 13.5	<0.001	<0.05
WHR	0.87 ± 0.09	0.96 ± 0.08	<0.001	<0.01
SBP (mmHg)	130.1 ± 18.2	139.2 ± 16.4	<0.01	<0.05
DBP (mmHg)	76.3 ± 8.2	80.7 ± 9.9	<0.01	ns
Glucose (mg/dl)	93.9 ± 11.8	140.9 ± 51.5	<0.001	<0.001
Insulin ( $\mu$ UI/ml)	8.42 ± 3.94	15.96 ± 13.80	<0.001	<0.01
HOMA-IR	1.99 ± 1.04	5.07 ± 3.34	<0.001	<0.001
HbA1c (%)	5.31 ± 0.32	6.80 ± 1.13	<0.001	<0.001
Total cholesterol (mg/dl)	201.2 ± 44.4	173.5 ± 36.2	<0.001	<0.001
HDL-c (mg/dl)	52.5 ± 13.0	44.8 ± 11.3	<0.001	<0.05
LDL-c (mg/dl)	133.6 ± 47.4	100.3 ± 31.5	<0.001	<0.001
Triglycerides (mg/dl)	85.5 (62.2; 117.8)	120.2 (93.5; 173.0)	<0.001	<0.01
hs-CRP (mg/l)	2.95 ± 3.03	4.86 ± 5.20	<0.05	Ns
Treatment (%)				
Antihypertensive	—	58.6		
Statins	—	70.8		
Fibrate	—	14.7		
Ezetimibe	—	2.9		
Metformin	—	84.0		
DPP-4 inhibitors	—	33.8		
Glitazones	—	7.2		
Sulfonylureas	—	5.9		
Glinides	—	4.4		
GLP-1 agonists	—	4.4		

Data are expressed as mean ± SD for parametric data or as median (25th and 75th percentiles) for nonparametric data. Means were compared by Student's *t*-test for normally distributed samples and Mann-Whitney *U* test for not normally distributed samples. Chi-square test was used to compare proportions among groups. HOMA-IR = fasting insulin (mU/ml) × fasting glucose (mM)/22.5.

BMI, body-mass index; DBP, diastolic blood pressure; DPP, dipeptidyl peptidase; GLP, glucagon-like peptide; HbA1c, glycated hemoglobin; 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; SBP, systolic blood pressure; T2D, type 2 diabetes; WHR, waist-to-hip ratio.

## AUTOPHAGY AND OXIDATIVE AND ER STRESSES IN DIABETES

higher weight, body-mass index (BMI), waist circumference, and waist-to-hip ratio (WHR) ( $p < 0.001$ ). Blood pressure was also higher in T2D patients than in controls ( $p < 0.01$ ). As expected, levels of glucose, insulin, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), and glycated hemoglobin (HbA1c) were higher in diabetic patients ( $p < 0.001$ ). Subjects with T2D had a typical lipid profile with increased levels of triglycerides ( $p < 0.001$ ) and reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) ( $p < 0.001$ ), although total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) levels were also reduced by statin treatment. The levels of high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) were increased in diabetic patients with respect to control subjects ( $p < 0.05$ ). When these parameters were adjusted for BMI, statistical differences remained, with the exception of diastolic blood pressure and hs-CRP levels.

Control subjects were not taking any medication at the time of the study. Among the 103 T2D patients, 58.6% were taking antihypertensive drugs, 70.8% statins, 14.7% fibrate, 2.9% ezetimibe, 84% metformin, 33.8% dipeptidyl peptidase (DPP)-4 inhibitors, 7.2% glitazone, 5.9% sulfonylurea, 4.4% glinide, and 4.4% glucagon-like peptide (GLP)-1 antagonists.

### Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Mass

As expected, the leukocytes from T2D patients showed higher levels of total reactive oxygen species (ROS) than those from control subjects (Fig. 1A, B,  $p < 0.01$ ) and enhanced mitochondrial ROS production (Fig. 1C, D,  $p < 0.05$ ), thus indicating conditions of oxidative stress. Diabetic patients displayed reduced nonyl acridine orange (NAO) fluorescence intensity in their leukocytes compared with controls (Fig. 1E, F,  $p < 0.05$ ), suggesting a reduction in mitochondrial mass.

### Nuclear Morphology

On evaluating the mean intensity of Hoechst fluorescence in the nucleus of each leukocyte, we observed a consistent and significant increase in T2D patients compared with controls ( $p < 0.05$ ), as shown in Figure 1G and H. Although not paralleled by a decrease in the nuclear area, this parameter is a hallmark of chromatin condensation (a typical apoptotic feature).

### ER Stress

As oxidative stress is closely related to ER stress, we explored whether UPR activation occurred in our T2D population by assessing protein levels of several ER stress markers. Cells from T2D patients displayed enhanced protein levels of the chaperone glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78) (Fig. 2A,  $p < 0.001$ ), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha (P-eIF2 $\alpha$ ) (Fig. 2B,  $p < 0.05$ ), and activating transcription factor 6 (ATF6) (Fig. 2C,  $p < 0.05$ ), indicating an activation of the UPR in T2D subjects.

### Autophagy

To test whether oxidative stress and activation of the UPR in leukocytes from T2D patients led to autophagy as a mechanism of stress recovery, we evaluated the expression of

different markers of autophagy. As shown in Figure 3, protein levels of LC3-II are increased (Fig. 3A,  $p < 0.05$ ) as well as Beclin1 levels (Fig. 3B,  $p < 0.05$ ) in T2D patients compared with control subjects, thus suggesting that autophagy was activated in the leukocytes of T2D patients.

### Correlations Among Autophagy and Oxidative and ER Stresses

In T2D patients, the mechanism of autophagy assessed by means of Beclin1 protein levels showed positive correlations with ROS content (Table 2;  $r = 0.667$ ,  $p < 0.05$ ) and ER stress activation measured by GRP78 and P-eIF2 $\alpha$  protein levels ( $r = 0.925$ ,  $p < 0.001$  and  $r = 0.644$ ,  $p < 0.05$ , respectively). Furthermore, LC3-II protein levels correlated positively with the ER stress markers, P-eIF2 $\alpha$  ( $r = 0.636$ ,  $p < 0.05$ ) and ATF6 ( $r = 0.601$ ,  $p < 0.05$ ). These associations between a situation of stress (oxidative and ER) and autophagy induction support our hypothesis that autophagy in T2D increases in parallel with oxidative stress and UPR activation.

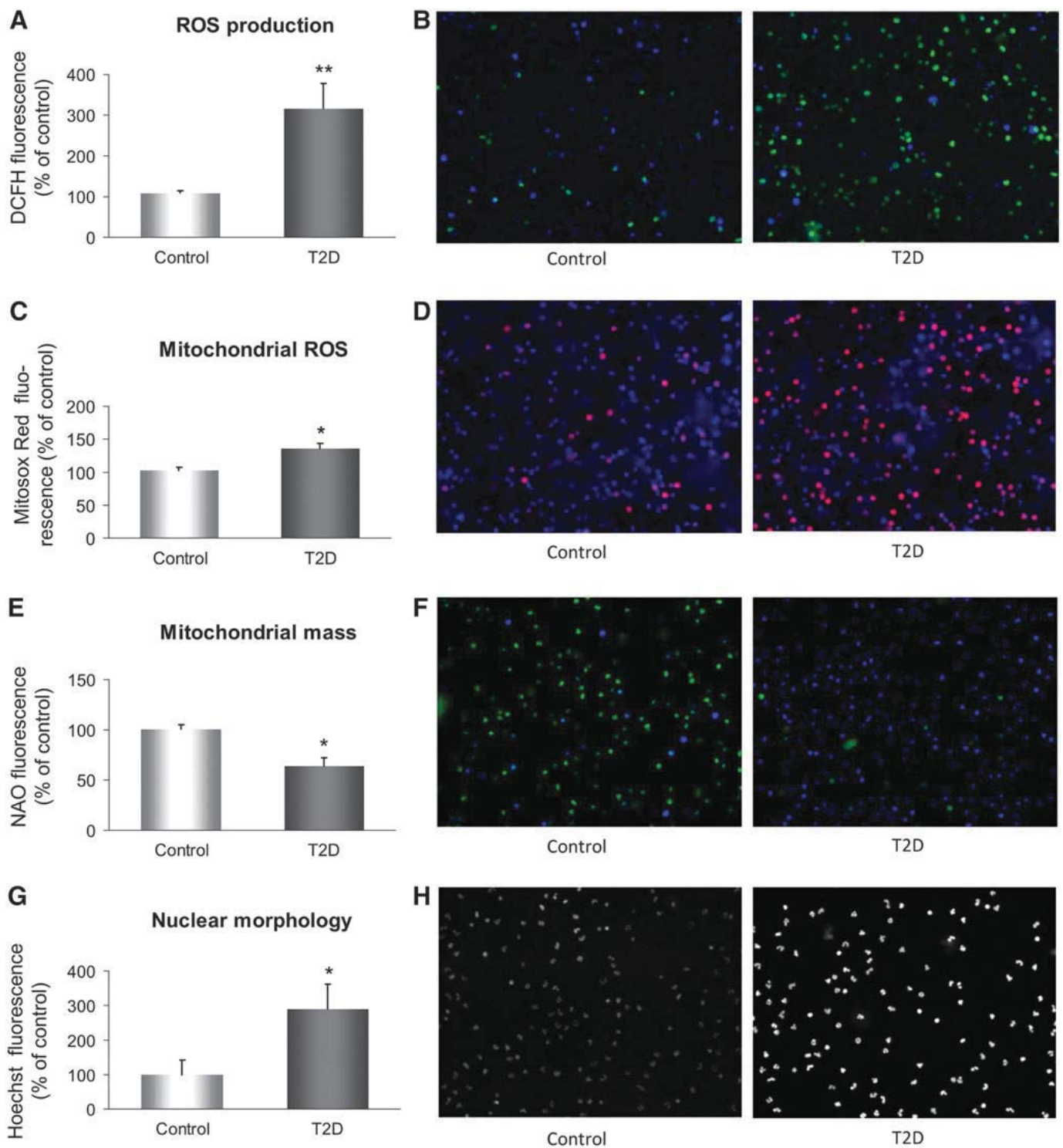
The results of the present study show an increase in body weight, BMI, waist circumference, WHR, blood pressure, glucose, insulin, HOMA-IR, and HbA1c levels in our T2D population. Leukocytes from these patients displayed features of oxidative stress (high ROS content and reduced mitochondrial mass), nuclear chromatin condensation, ER stress, and increased autophagy. In addition, the activation of the autophagic machinery seemed to occur in parallel to oxidative stress and UPR activation as autophagy markers correlated positively with ROS production and ER stress-activated proteins.

As we have previously shown in a different cohort of T2D patients, leukocyte total and mitochondrial ROS production are enhanced and mitochondrial mass is reduced (4, 5). Our current data are in line with those findings and widen our perspective by revealing an increase in chromatin condensation in leukocyte nuclei.

Among the mechanisms that might be altered in peripheral blood cells under pathological conditions such as chronic hyperglycemia (a characteristic of T2D), oxidative stress seems to play a major role, but other mechanisms such as ER stress are also implicated (7). The present study shows an increase in ER stress markers in leukocytes from T2D patients, which display enhanced GRP78, P-eIF2 $\alpha$ , and ATF6 protein levels.

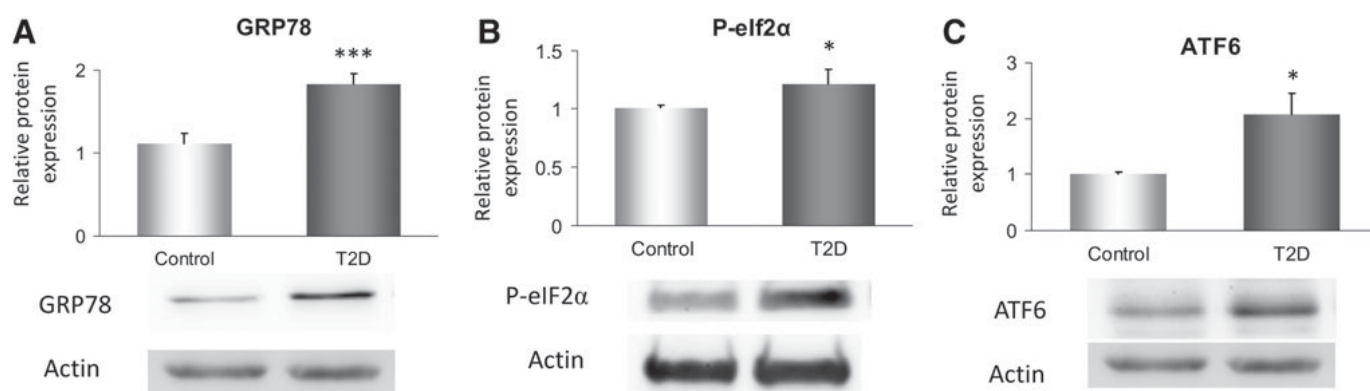
Continuous ER stress promotes autophagic clearance of misfolded proteins, which act as a mechanism of stress recovery. We explored autophagy in T2D patients by measuring Beclin 1 and LC3-II protein levels and found increases in both proteins, thus suggesting underlying autophagy activation.

Autophagy can also be induced by ROS signaling, and mitochondria are likely to be main players as they are the main source of ROS. In this sense, it has been reported that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promotes beclin 1 expression and autophagosome formation by targeting Atg4, leading eventually to LC3 lipidation. Moreover, another free radical, superoxide, plays a major role in autophagy induction under oxidant conditions (9). Our results are in accordance with these findings and indicate that autophagy was enhanced in our T2D population and that Beclin 1 levels correlated positively with total ROS production.



**FIG. 1.** Leukocyte total and mitochondrial ROS production, mitochondrial mass, and nuclear morphology in T2D and control subjects. (A) ROS production (DCFH-DA fluorescence) in T2D compared with controls. (B) Representative fluorescence microscopy images depicting DCFH-DA fluorescence intensity (*green signal*) in a control subject and a T2D patient. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (*blue*). (C) Mitochondrial ROS (Mitoxox Red fluorescence) in T2D *versus* control subjects. (D) Representative images displaying Mitoxox Red fluorescence (*red signal*) in a control subject and a T2D patient. (E) Mitochondrial mass (NAO fluorescence) in T2D and control subjects. (F) Representative images showing NAO fluorescence (*green signal*) in a control subject and a T2D patient. (G) Nuclear morphology by Hoechst staining in controls and T2D patients. (H) Representative fluorescence microscopy images of Hoechst fluorescence intensity. Values in bar graphs were obtained by calculating the percentage of fluorescence intensity relative to the control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  T2D *versus* control group. DCFH-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; NAO, nonyl acridine orange; ROS, reactive oxygen species; T2D, type 2 diabetes.

## AUTOPHAGY AND OXIDATIVE AND ER STRESSES IN DIABETES



**FIG. 2.** Evaluation of ER stress in T2D and control subjects. (A) Quantification of GRP78 protein levels and representative WB images of GRP78 and actin. (B) Quantification of P-eIF2 $\alpha$  protein levels and representative WB images depicting P-eIF2 $\alpha$  and actin. (C) Quantification of ATF6 protein levels and WB representative images of ATF6 and actin. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  T2D versus control group. ATF6, activating transcription factor 6; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, glucose-regulated protein 78 kDa; P-eIF2 $\alpha$ , phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha; WB, Western blotting.

Accumulating evidence supports a role for autophagy in the removal of damaged mitochondria as a mechanism of controlling excessive ROS production, a process known as mitophagy. Our results suggest that the activation of autophagy in leukocytes from T2D patients is not sufficient to reduce ROS production, which could be explained by the fact that most leukocytes that are activated by the chronic inflammatory state that underlies diabetes and autophagosomes in activated leukocytes preferentially capture other cytosolic components rather than mitochondria (6).

Additionally, autophagy is upregulated under ER stress as a mechanism of clearance of misfolded proteins. Specifically, ER stress may induce autophagy by downregulation of the AKT/TSC/mTOR pathway, by LC3 lipidation to LC3-II mediated by PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation, and by transcriptional activation of autophagy-related genes (2). Furthermore, the ER may serve as a source of membranes for autophagosome formation (3).

When we explored potential correlations among ER stress parameters and autophagic markers, we observed that LC3-II

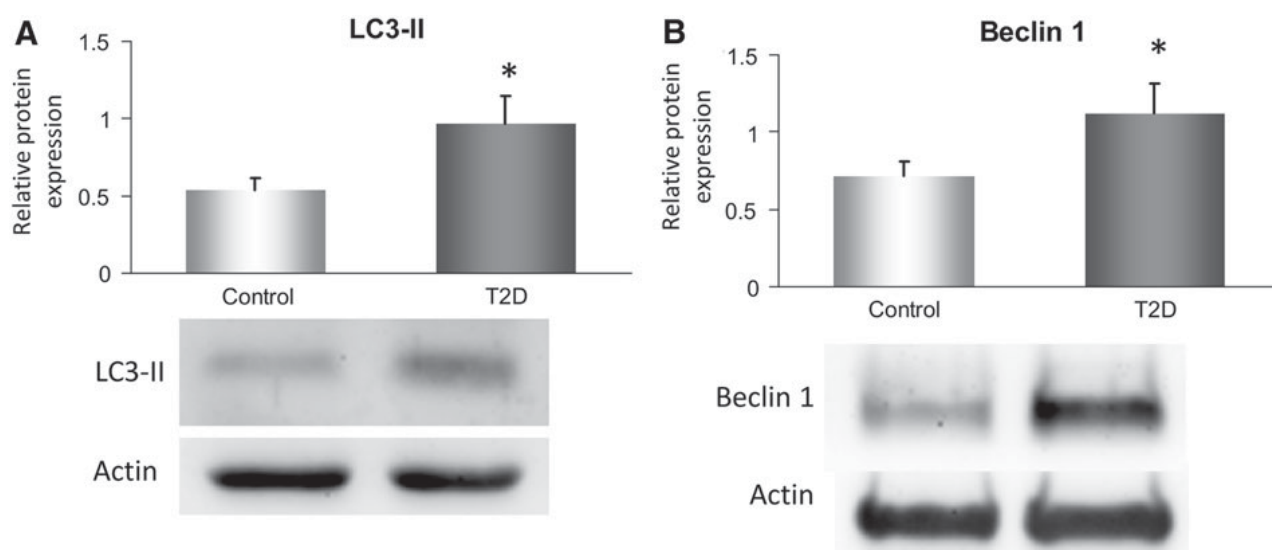
protein levels correlated with P-eIF2 $\alpha$  and ATF6, and that Beclin 1 protein levels correlated positively with GRP78 and P-eIF2 $\alpha$ , indicating that UPR activation occurs in parallel with autophagy in T2D subjects.

Taken as a whole, our findings lead to the hypothesis that both oxidative and ER stress signaling pathways are involved in autophagy induction in the leukocytes of a large cohort of T2D patients. Further studies are required to clarify how autophagy induction in peripheral blood cells has a bearing on the pathophysiology of T2D and to validate potential therapeutic approaches aimed at normalizing leukocyte autophagy to improve immune function during T2D.

## Notes

### Subjects

A total of 103 T2D patients and 109 age- and sex-matched control subjects were enrolled in our study. Patients were attending the Endocrinology and Nutrition Service of the University Hospital Doctor Peset at the time of the study.



**FIG. 3.** Autophagy activation in T2D versus control subjects. (A) Quantification of LC3-II protein levels evaluated by WB and representative images displaying LC3-II and actin. (B) Quantification of Beclin1 protein levels and representative WB images of Beclin1 and actin. \* $p < 0.05$  when T2D patients were compared with controls. LC3, microtubule-associated protein light chain 3.

TABLE 2. CORRELATION AMONG OXIDATIVE AND ER STRESS PARAMETERS AND AUTOPHAGY

	<i>ROS production</i>		<i>GRP78</i>		<i>P-eIF2<math>\alpha</math></i>		<i>ATF6</i>	
	r	p-Value	r	p-Value	r	p-Value	r	p-Value
Beclin 1	0.667	<0.05	0.925	<0.001	0.644	<0.05	0.346	0.328
LC3-II	0.460	0.113	0.299	0.298	0.636	<0.05	0.601	<0.05

Correlation coefficients were estimated by Pearson's correlation.

ATF6, activating transcription factor 6; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, glucose-regulated protein 78 kDa; LC3, microtubule-associated protein light chain 3; P-eIF2 $\alpha$ , phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha; ROS, reactive oxygen species.

Diagnosis of T2D was according to the American Diabetes Association's criteria. Exclusion criteria were abnormal hematological profile, presence of malignant neoplasm, presence of any autoimmune disease, and the use of antioxidant supplements.

All participants underwent a physical examination during the first visit. Weight, height, BMI, waist and hip circumference, and blood pressure were recorded.

Written informed consent was obtained from all subjects. The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and approval was obtained from the ethics committee of the University Hospital Doctor Peset.

#### Biochemical measurements

Fasting serum samples were obtained after blood centrifugation at 1500 g for 10 min at 4°C, after which glucose, total cholesterol, and triglyceride levels were determined using an enzymatic method. Insulin levels were assessed by immunochemiluminescence. The HOMA-IR was used to estimate insulin resistance (HOMA-IR = [fasting glucose in mg/dl  $\times$  fasting insulin in  $\mu$ UI/ml]/405). An automatic glycohemoglobin analyzer (Arkay, Inc., Kyoto, Japan) was employed to determine HbA1c. LDL cholesterol levels were calculated with Friedewald's formula, HDL cholesterol levels were determined by a direct method with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp, Brea, CA), and hs-CRP levels were assessed by immunonephelometry.

#### Leukocyte isolation

Citrated blood samples were incubated with 3% dextran for 45 min. The supernatant was released over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and centrifuged for 25 min at 650 g. The pellet was resuspended in lysis buffer, incubated for 5 min at room temperature, centrifuged for 5 min at 240 g, and washed and resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Cells were then counted in a Scepter 2.0 cell counter (Millipore, Bedford, MA).

#### Fluorescence microscopy

The fluorescent probe, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 5  $\mu$ M), was used to quantify total ROS production, and Mitosox Red (5  $\mu$ M) was employed to assess mitochondrial ROS production. Mitochondrial mass was estimated by means of NAO (1  $\mu$ M) fluorescence. Nuclei were stained with the chromatin-specific dye, Hoechst 33342

(2.5  $\mu$ M). Leukocytes were seeded in 48-well plates and incubated for 30 min with the respective fluorochrome and washed with HBSS. Analysis was performed in 16 images per well and recorded with an IX81 Olympus fluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany), and the static cytometry software, ScanR version 2.03.2 (Olympus), was used to quantify fluorescence individually (per cell). Fluorescent probes were purchased from Invitrogen (Life Technologies, Barcelona, Spain).

#### Western blot

Leukocytes were lysed in cell lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.1 mM EDTA, 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.5% NP-40, dithiothreitol 1 mM) containing protease inhibitors (10 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM PNP, 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate) on ice for 15 min. Protein extracts were obtained after centrifugation and quantified by bicinchoninic acid (Thermo Scientific, Rockford, IL). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to the nitrocellulose membrane, and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The following antibodies were used: anti-GRP78 (Abcam, Cambridge, MA), anti-eIF2 $\alpha$ -pS<sup>52</sup> (Life Technologies), anti-ATF6 (cleaved form; Thermo Scientific), anti-LC3 (Millipore Iberica, Madrid, Spain), anti-Beclin1 (Millipore Iberica), anti-actin (Sigma Aldrich), horseradish peroxidase (HRP) goat anti-mouse (Thermo Scientific), and HRP goat anti-rabbit (Millipore Iberica). Following incubation of membranes with ECL plus reagent (GE Healthcare) or Supersignal West Femto (Thermo Scientific), protein bands were detected in a Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). Protein expression was quantified by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat).

#### Statistical analysis

We used SPSS 17.0 to perform statistical analysis. Data in Table 1 are expressed as mean  $\pm$  standard deviation for parametric data and median and 25th and 75th percentiles for nonparametric data. Bar graphs in figures represent mean  $\pm$  standard error. Comparisons between the control group and T2D subjects were performed using an unpaired Student's *t*-test and adjusted by BMI by means of a univariate general linear model. Chi-square was employed to compare proportions. Correlations were calculated using Pearson's correlation coefficient. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## AUTOPHAGY AND OXIDATIVE AND ER STRESSES IN DIABETES

## Acknowledgments

The authors thank Isabel Soria for her work in the extraction of biological samples (University Hospital Dr. Peset) and B. Normanly for his editorial assistance (University of Valencia). This study was financed by grants, PI13/1025, PI12/1984, PI13/0073, CIBERehd CB06/04/0071, PROMETEO 2010/060, UGP-14-93, UGP-14-95, and by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”). S.R.-L. is a recipient of a predoctoral fellowship from Carlos III Health Institute (FI11/00637). C.B. is a recipient of a postdoctoral contract from Carlos III Health Institute (CD14/00043). 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 CP10/0360, respectively).

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

1. Donath MY and Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11: 98–107, 2011.
2. Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, Watada H, and Wiley JW. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* 7: 2–11, 2011.
3. Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, and Rucker EB 3rd. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy* 9: 951–972, 2013.
4. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Apostolova N, Borrás C, Jover A, Bañuls C, Sola E, and Victor VM. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 50: 1215–1221, 2011.
5. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls 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.
6. Hubbard VM, Valdor R, Patel B, Singh R, Cuervo AM, and Macian F. Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *J Immunol* 185: 7349–7357, 2010.
7. Hummasti S and Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 107: 579–591, 2010.
8. Rovira-Llopis S, Bañuls 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.
9. Scherz-Shouval R and Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 36: 30–38, 2011.

Address correspondence to:

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

E-mail: victor.victor@uv.es

Prof. Antonio Hernández-Mijares  
Service of Endocrinology  
Foundation for the Promotion of Health and Biomedical  
Research in the Valencian Region (FISABIO)  
University Hospital Doctor Peset  
Avda Gaspar Aguilar 90  
Valencia 46017  
Spain

E-mail: hernandez\_antmij@gva.es

Date of first submission to ARS Central, July 22, 2015; date of acceptance, July 25, 2015.

## Abbreviations Used

ATF6	= activating transcription factor 6
BMI	= body-mass index
DBP	= diastolic blood pressure
DPP	= dipeptidyl peptidase
DCFH-DA	= 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
ER	= endoplasmic reticulum
GLP	= glucagon-like peptide
GRP78	= glucose-regulated protein 78kDa
HbA1c	= glycated hemoglobin
HBSS	= Hank's Balanced Salt Solution
HDL-c	= high-density lipoprotein cholesterol
HOMA-IR	= homeostasis model assessment of insulin resistance
HRP	= horseradish peroxidase
hs-CRP	= high-sensitive C-reactive protein
LC3	= microtubule-associated protein light chain 3
LDL-c	= low-density lipoprotein cholesterol
NAO	= nonyl acridine orange
P-eIF2 $\alpha$	= phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha
ROS	= reactive oxygen species
SBP	= systolic blood pressure
T2D	= type 2 diabetes
UPR	= unfolded protein response
WB	= Western blotting
WHR	= waist-to-hip ratio





## 4. DISCUSIÓN



En los últimos 50 años la obesidad se ha incrementado de manera alarmante a nivel mundial y, según los estudios, la tendencia seguirá en aumento si no se lleva a cabo una intervención a medida. Existe una estrecha relación entre la obesidad, la RI y el desarrollo de DM2, por tanto los casos de DM2 aumentarán de forma paralela a la epidemia de la obesidad. Entender las bases fisiopatológicas de la DM2 es un objetivo primario en la investigación tanto básica como clínica, para permitir el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas de esta enfermedad.

El planteamiento de esta tesis es precisamente el de aportar conocimientos acerca de los mecanismos que subyacen a la DM2, así como a las complicaciones vasculares derivadas que suponen el principal motivo de muerte prematura en estos pacientes.

En esta tesis empleamos distintas cohortes de pacientes con DM2 establecida de al menos 2 años de evolución que acudieron al Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Todos los pacientes estudiados estaban bajo tratamiento con antidiabéticos orales, la mayoría de ellos con metformina (85% aproximadamente) y, en menor proporción, otros fármacos como los inhibidores de DPP-4, sulfonilureas, glinidas y tiazolidinedionas. Para la caracterización de estos pacientes se compararon con sus correspondientes grupos de sujetos control, ajustados por edad y sexo.

Los pacientes diabéticos presentaron obesidad abdominal, mostrando un mayor índice de masa corporal (IMC) y una circunferencia de cintura elevada en comparación con los sujetos control, así como una mayor presión arterial. Se evidenció la marcada RI que presentaban, observándose mayores niveles de glucosa en ayunas así como de insulina y, por tanto, un incremento en el índice HOMA-IR. A su vez, la HbA1c se vio marcadamente aumentada en la población diabética como consecuencia de la falta de control glicémico característico de la DM2. Las principales recomendaciones de manejo de la DM2, recogidas en guías clínicas especializadas y elaboradas por expertos, aconsejan que los valores de HbA1c no superen el 7% para evitar el riesgo de complicaciones vasculares (American Diabetes Association, 2012). Por tanto, este parámetro es clave para la evaluación de la evolución de la enfermedad. En cuanto al perfil lipídico de los pacientes con DM2, en nuestros estudios observamos un aumento de triglicéridos y unos niveles de colesterol-HDL reducidos, ambas características de la dislipidemia aterogénica. Se sabe que, además de estas características, existe una predominancia de partículas LDL pequeñas y densas en los pacientes con DM2, que participan en el proceso de

aterosclerosis. Una de las razones por las cuales existe una mayor presencia de lípidos circulantes en la DM2 es que en estos pacientes el transporte reverso de colesterol está alterado (Borggreve SE. *et al.*, 2003). Además, existe una menor captación de ácidos grasos a nivel muscular como resultado de la RI, favoreciendo una mayor presencia de ácidos grasos circulantes que, finalmente, son captados por el hígado. Como consecuencia, a nivel hepático ocurre una mayor síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), los triglicéridos de estas partículas se intercambian por colesterol de las partículas de HDL y LDL, formándose finalmente las partículas de LDL pequeñas y densas (Krauss RM., 2004). Se estima que gran parte del riesgo de complicaciones macrovasculares en la DM2 es consecuencia de la dislipidemia, a diferencia del riesgo de complicaciones en los vasos pequeños, cuyo principal desencadenante es la hiperglicemia (Mooradian AD., 2009). Se ha descrito que el tratamiento con fármacos hipolipemiantes como las estatinas, disminuye el riesgo de mortalidad por cualquier evento cardiovascular y que, además, estos efectos son mayores en pacientes con DM2 (Pyörälä K. *et al.*, 1997). Aproximadamente el 70% de nuestra población diabética tomaba estatinas.

La inflamación sistémica característica de la DM2 la encontramos representada en nuestra población de pacientes diabéticos con unos niveles elevados de PCR. Esta proteína es un reactante de fase aguda, se sintetiza en el hígado y se ha descrito además como un factor de riesgo independiente de enfermedad coronaria (Pearson TA., 2003). En la población diabética, debido al riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, es fundamental la monitorización de los niveles de marcadores inflamatorios como la PCR. Además, las citoquinas proinflamatorias liberadas por los monocitos o macrófagos activados y por los adipocitos son especialmente relevantes en el contexto de la obesidad y la DM2 por su papel determinante en el desarrollo de RI (Wellen KE. *et al.*, 2005; Xu H. *et al.*, 2003). En los pacientes estudiados, observamos una marcada presencia de citoquinas circulantes, en concreto, IL6 y TNF $\alpha$  mostraron niveles aumentados en el suero de los pacientes con DM2 respecto a la población control. Este estado de inflamación crónica es distinto del proceso de inflamación clásico originado por infección, en este caso se produce en respuesta a estímulos metabólicos y se mantiene en un niveles subagudos constantes. Bajo estas condiciones se induce la producción de moléculas de adhesión celular, como la E-selectina, sintetizada en las células endoteliales en respuesta a citoquinas proinflamatorias (Gahmberg CG. *et al.*, 1998). Se sabe que el proceso de marginalización de los leucocitos a lo largo de las paredes endoteliales, y su adhesión y transmigración a través de ellas está mediado por diferentes moléculas de adhesión,

entre las que se incluyen selectinas, VCAM-1 e ICAM-1. De hecho, en nuestra población diabética, acompañando al incremento en citoquinas proinflamatorias se observó un aumento significativo de las moléculas E-selectina y VCAM-1. En consonancia, la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular resultó estar también aumentada. Así, observamos una menor velocidad de rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio y un mayor flujo de rodamiento, reflejando que en la DM2 los leucocitos tienden a frenarse cuando se acercan a las células endoteliales. A su vez, el número de leucocitos que permanecen adheridos al endotelio es también mayor. Cuando estas interacciones están incrementadas se favorece la disfunción endotelial y el daño vascular característico de múltiples enfermedades cardiovasculares. Para el estudio de estas propiedades de la dinámica leucocitaria se empleó un sistema *in vitro* de cámara de flujo paralelo en la que leucocitos humanos fluyen sobre una monocapa de células endoteliales humanas con unas condiciones similares a las observadas en el sistema cardiovascular. Con este modelo se reproduce el proceso que precede a la infiltración de leucocitos *in vivo*, siendo crítico para la homeostasis y la integridad del sistema vascular (Goetz DJ. *et al.*, 1999). Al profundizar en el estudio de esta situación de inflamación e infiltración leucocitaria en la DM2, observamos que el control glicémico de la enfermedad es determinante en la inducción de este estado. A mayores niveles de HbA1c existen también mayores niveles de PCR, TNF $\alpha$  y E-selectina y, por tanto, un proceso inflamatorio acentuado con respecto a los pacientes cuya glicemia está mejor controlada. Los leucocitos del grupo de pacientes con mal control glicémico mostraron además un mayor flujo de rodamiento sobre el endotelio, lo que parece indicar que su nivel de activación es mayor que en los pacientes con buen control.

El aumento de las moléculas de adhesión en la DM2 es bien conocido e indicativo del mayor riesgo de ECV que presentan este grupo de pacientes (Blüher M. *et al.*, 2002; Mazzone T. *et al.*, 2008). Aunque la hiperglicemia parece ser el factor clave en la inducción de la inflamación y de la adhesión de leucocitos al endotelio, no se conocen con precisión los mecanismos mediadores. El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son características comunes en pacientes con DM2, tanto en los tejidos metabólicos como en los del sistema cardiovascular (Mogensen M. *et al.*, 2007; Boudina S. *et al.*, 2005). El papel de estos mecanismos en la disfunción endotelial es bien conocido. Se sabe que la producción de radicales libres contribuye a la adhesión leucocitaria a través de la inactivación del NO por parte del ion  $O_2^{\cdot-}$ , producido en condiciones de hiperglicemia (Kubes P. *et al.*, 1991). Esta disminución de NO provoca

la activación de NF- $\kappa$ B, promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión en las células endoteliales.

Numerosos estudios describen la participación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la DM2 (Victor VM. *et al.*, 2011). En consonancia y de manera generalizada, en nuestros pacientes diabéticos observamos que existe una excesiva producción de ERO, una disminución de las defensas antioxidantes y una menor masa mitocondrial en los leucocitos. A su vez, se manifiesta una disfunción mitocondrial a través de una reducción del potencial de membrana y una menor respiración mitocondrial. Estas observaciones concuerdan con estudios previos en los que se ha detectado una morfología mitocondrial alterada junto con una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y una reducción de la masa mitocondrial en células mononucleares de pacientes con DM2 (Yu T. *et al.*, 2006; Widlansky ME. *et al.*, 2010). Las alteraciones en el potencial de membrana de la mitocondria desequilibran el flujo de protones a través de los complejos de la CTE. Como consecuencia, la producción de energía se ve comprometida, puesto que este flujo de protones es esencial para la generación de ATP en el complejo V. Esta perturbación, junto con la menor tasa de respiración mitocondrial observada en estos leucocitos, pone de manifiesto el alcance del daño oxidativo que ocurre en la DM2, ya que la generación de ERO en la mitocondria sería el desencadenante de este conjunto de alteraciones en la homeostasis mitocondrial. Concretamente, se ha demostrado previamente que el complejo I mitocondrial es la principal diana de las ERO en la DM2 y su perturbación es la base de la disfunción mitocondrial observada en los pacientes diabéticos (Hernández-Mijares A. *et al.*, 2011). A su vez, alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, que son claves en el mantenimiento de la homeostasis energética celular, se han relacionado con la DM2 (Shenouda SM. *et al.*, 2011). Todas estas evidencias demuestran que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial forman parte de la fisiopatología de la DM2. Por ello, diversas estrategias enfocadas hacia la mejora de estas anomalías han sido estudiadas. Por ejemplo, se ha especulado sobre el potencial uso de agentes farmacológicos que promuevan la biogénesis mitocondrial, apuntando a que podrían mejorar la homeostasis de la glucosa en el contexto de la DM2 (Zamora M. *et al.*, 2015). En pacientes con síndrome metabólico la suplementación con coenzima Q10, conocido antioxidante, mejora la situación de resistencia a la insulina, reduciendo los valores del índice HOMA-IR (Raygan F. *et al.*, 2015). La metformina, tratamiento de primera elección para la DM2, ha demostrado actuar en parte a través de la disminución del estrés

oxidativo (Esteghamati A. *et al.*, 2013), propiedad que también ha sido demostrada en los inhibidores de DPP-4 (Rizzo MR. *et al.*, 2012).

Se sabe que la RI está mediada por la señalización por ERO, lo cual se evidencia al observar mayores niveles de ERO en células en cultivo que presentan RI y un aumento en la sensibilidad a la insulina al ser tratadas con antioxidantes (Houstis N. *et al.*, 2006). En humanos se ha observado también un incremento de marcadores de estrés oxidativo en condiciones de RI (Urakawa H. *et al.*, 2003). En nuestro análisis del estrés oxidativo, en los pacientes con DM2, observamos además que el control glicémico influye en la producción de ERO, de modo que cuanto peor es el control de los niveles de glucosa en sangre mayor es la producción de radicales libres en los leucocitos. Es bien conocido el papel que juega la hiperglicemia en la generación de ERO, por lo tanto nuestros resultados demuestran que se cumple esta evidencia también en los leucocitos circulantes. Las consecuencias de esta activación en la generación de ERO podrían ser el aumento de contacto entre estos leucocitos y el endotelio, dado que la regulación de ambos procesos ocurre en paralelo y como consecuencia del control glicémico, como hemos mencionado anteriormente.

En esta tesis profundizamos en las implicaciones que pueden tener los desequilibrios intracelulares anteriormente descritos en el curso de la DM2, centrándonos en una de las complicaciones vasculares más comunes y deletéreas de la enfermedad, la cardiopatía isquémica. Escogimos pacientes con CIS, una anomalía cardíaca asintomática que precede al desarrollo de cardiopatía diabética, debido a que no existen estudios que indaguen en la fisiopatología a nivel molecular en esta fase tan temprana. Sí se ha estudiado el papel de la mitocondria en la función cardíaca en la DM2, estableciéndose que la funcionalidad de las mitocondrias es crucial en el miocardio para mantener el equilibrio energético adecuado. Se evidencia el papel clave del estrés oxidativo en la disfunción cardíaca al observar la mejora en la función diastólica ventricular en ratones diabéticos como resultado de la reducción del estrés oxidativo tras un tratamiento con coenzima Q10 (Huynh K. *et al.*, 2012). De hecho, se sabe que los pacientes diabéticos muestran una alteración en la capacidad oxidativa mitocondrial relacionada con la aparición de problemas cardíacos (Scheuermann-Freestone M., 2003; Boudina S. *et al.*, 2005). Concretamente, en la DM2 la capacidad contráctil del músculo cardíaco está comprometida como consecuencia de la disfunción mitocondrial observada en este tejido, además se sabe que el daño ocurre a nivel del complejo I mitocondrial (Croston TL. *et al.*, 2014). A su vez tras un infarto de miocardio, la disfunción

mitocondrial sería una de las principales alteraciones intracelulares en los cardiomiocitos (Sena S. *et al.*, 2009). Por lo tanto, parece evidente que la mitocondria es uno de los principales motores del corazón, y que su correcto funcionamiento es crucial para mantener la función cardíaca.

En nuestra población de pacientes con DM2, observamos que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo presentes en todos ellos, estaban mucho más acentuados en los pacientes que además presentaban CIS. Esta misma correlación con la CIS se observó en los parámetros de inflamación, citoquinas y moléculas de adhesión, así como en las medidas de interacción leucocito-endotelio, habiendo una menor velocidad de rodamiento, mayor flujo y más adhesión de los leucocitos en los pacientes con CIS que en los que no tenían esta alteración. Con ello evidenciamos que la cardiopatía diabética viene precedida por un estado de inflamación acentuado, y una mayor tendencia de acercamiento y unión de los leucocitos al endotelio vascular. También nuestro estudio apunta a que, previo al desarrollo y establecimiento de la cardiopatía diabética, la disfunción mitocondrial formaría parte de la fisiopatología que hace que la situación de hiperglicemia y RI se traduzca en problemas cardíacos, cuyas consecuencias podrían ser fatales. Es por ello que estos resultados podrían contribuir al diseño de estrategias preventivas en pacientes con predisposición a desarrollar este tipo de anomalías. Un ejemplo sería el uso de antioxidantes con diana en la mitocondria, cuyos efectos, al estar precisamente dirigidos a éste orgánulo, no interfieren con la señalización redox citosólica y fisiológicamente esencial (Apostolova N. *et al.*, 2014).

Además de la mitocondria, otras fuentes de ERO son relevantes y, en particular, en los leucocitos diversas enzimas participan en la eliminación de microorganismos a través de la generación de ERO. La MPO es una de las enzimas oxidativas más importantes en este tipo celular, sin embargo, su elevada actividad puede conducir al daño vascular que precede la aparición de enfermedades cardiovasculares. En el contexto de la DM2 existe controversia en cuanto a los niveles y/o la actividad de la MPO en suero. Por ejemplo, la actividad de la MPO se encontró reducida en pacientes con DM2, relacionándose con la mayor susceptibilidad a infecciones que presentan estos pacientes (Sato N. *et al.*, 1997, Uchimura K. *et al.*, 1999). Sin embargo, otros estudios mostraron que los niveles de MPO eran similares en pacientes que en controles (Schindhelm. *et al.*, 2008), o elevados significativamente en DM2, pudiendo contribuir a la progresión de aterosclerosis en estos pacientes (Wiersma. *et al.*, 2008). Estas discrepancias podrían surgir por diversas razones, como la heterogeneidad en



las poblaciones de estudio, la valoración de distintos parámetros (actividad o concentración de MPO), los distintos métodos de ELISA que dan lugar a grandes diferencias en cuanto a la mediana de concentración de MPO, el tipo de muestra (leucocitos, suero o plasma) e incluso el tratamiento de las muestras, ya que si no se mantienen en frío inmediatamente después de la extracción, los leucocitos siguen liberando MPO (Strobel NA. *et al.*, 2011). No existen estudios que determinen el papel de la MPO en la inducción de las complicaciones microvasculares de la DM2. Dada la alta tasa de nefropatía diabética en los pacientes con DM2, y conociendo el papel determinante del daño oxidativo a nivel microvascular en la inducción de alteraciones renales, nos planteamos evaluar si la MPO participaba en este proceso.

En nuestro grupo de pacientes con DM2 observamos unos niveles aumentados de MPO en suero y, en particular, este aumento fue mayor en los pacientes que sufrían nefropatía, habiendo además una correlación positiva entre la concentración de MPO y el ratio albúmina/creatinina indicativo de la presencia de nefropatía. A su vez, los pacientes con nefropatía mostraron una mayor frecuencia de contacto entre leucocitos y endotelio, además de un mayor incremento en los niveles de TNF $\alpha$  y E-selectina. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo presente en leucocitos de pacientes con DM2 es consecuencia, no solo de la disfunción mitocondrial, sino también de la acumulación de ERO generadas por la MPO y que, probablemente, esta enzima participe en las alteraciones a nivel microvascular que preceden al desarrollo de nefropatía en las que participaría también la señalización proinflamatoria. El daño vascular originado por la actividad de la MPO es consecuencia de la liberación continua de ERO que ejerce en el endotelio vascular, en contraste con la actividad de otras enzimas como la NADPH oxidasa derivada de los leucocitos que, cuando es activada, libera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera aguda y, por tanto, transitoria (Zhang C. *et al.*, 2003). También la MPO se ha relacionado en múltiples estudios con la ECV, señalándola además como un posible biomarcador y un factor de riesgo independiente de muerte por causa cardiovascular (Tang WH. *et al.*, 2009; Strobel NA. *et al.*, 2011; Scharnagl H. *et al.*, 2014). De hecho, también se ha descrito que participa en la oxidación de las partículas de colesterol LDL y HDL, lo que implica que podría tener un papel relevante en el contexto de la aterosclerosis. Recientemente se ha publicado un estudio en el que se evaluó la relación entre los niveles de MPO y la progresión de aterosclerosis en pacientes con DM2 que presentaban coronariopatía. A pesar de que no se encontraron diferencias entre los niveles de MPO en sujetos sanos frente a diabéticos, en este último grupo los niveles de MPO se correlacionaban con la progresión de la enfermedad coronaria (Kataoka Y.

*et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha descrito anteriormente la correlación entre los niveles de MPO y la aparición de nefropatía ni tampoco la posible influencia de esta enzima con el incremento de la adhesión leucocitaria en la DM2. Nuestros resultados plantean la hipótesis de que el papel de la MPO en la DM2 podría estar relacionado con la inducción de interacciones leucocito-endotelio. En este sentido, sí se ha especulado sobre un posible mecanismo de atracción de los leucocitos hacia las células endoteliales mediado por la MPO. Este mecanismo se basaría en que la MPO, al poseer una carga positiva, favorecería el acercamiento de los leucocitos al endotelio, ambos tipos celulares con cargas negativas en su superficie que promoverían una repulsión (Klinke A. *et al.*, 2011). Este proceso podría indicar que los pacientes con mayores niveles de MPO circulante poseerían un mayor riesgo de sufrir enfermedades vasculares y, en concreto en la DM2, del desarrollo de complicaciones macro- y/o microvasculares. Aunque para establecer esta relación es necesaria una investigación profunda de la acción de la MPO en el sistema vascular, así como estudios prospectivos en amplias cohortes de pacientes diabéticos, que permitan valorar la influencia de la MPO en el desarrollo de problemas en el sistema cardiovascular a largo plazo.

Junto al estrés oxidativo se ha descrito que el estrés de RE participaría en la inducción de RI, ya que al tratar células con taspigargina, un inductor de estrés de RE, se impide la fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS-1, bloqueándose la vía de señalización por insulina. Estas alteraciones se han observado tanto en modelos murinos de DM2 como en pacientes diabéticos, estableciéndose así el estrés de RE como una de las características centrales de esta enfermedad (Ozcan U. *et al.*, 2004; Jeong YT. *et al.*, 2013; Komura T. *et al.*, 2010). Sin embargo, la manera en que se regula la respuesta al estrés de RE, conocida como UPR, en la DM2 no se conoce en profundidad al igual que tampoco se sabe cómo el control glicémico podría estar afectando a esta señalización.

Al analizar la posible presencia de estrés de RE en leucocitos de pacientes con DM2, observamos en efecto que la señalización UPR está inducida, aunque el patrón de activación de ésta no se manifestó igual en todos los pacientes. Los resultados obtenidos sugieren que la DM2 estimula la respuesta al estrés de RE de forma mantenida, con niveles de GRP78 altos, y de forma adaptativa activando la ruta de sXBP1 mientras el metabolismo de la glucosa está controlado. En cambio cuando la hiperglicemia se manifiesta de forma crónica y descontrolada las células cambian su respuesta, dado que no son capaces de adaptarse, activando el factor proapoptótico

CHOP que conduciría a los leucocitos a la muerte celular. Asimismo esta señalización proapoptótica en los pacientes con mal control glicémico se acompañó de mayores niveles de ERO, los cuales se sabe que interactúan directamente con la vía de apoptosis intrínseca induciendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria, evento crucial en el proceso de apoptosis (Wu CC. *et al.*, 2013). Además demostramos que existe una expresión diferencial de los marcadores de estrés de RE en función del grado de control glicémico, con una activación de la vía de IRE1, evaluada mediante el mediador sXBP1, en situación de buen control de la DM2, y una activación exclusiva de la ruta de ATF6 en situación de hiperglicemia no controlada. A favor de nuestras observaciones, en un estudio anterior se demostró que la expresión de marcadores de estrés de RE en monocitos de pacientes con síndrome metabólico estaba incrementada y que, además, estos niveles de expresión se correlacionaban con los niveles de glucosa en sangre (Sage AT. *et al.*, 2012). Por lo tanto, observamos que las perturbaciones en el metabolismo a nivel sistémico alteran la homeostasis a nivel celular, y que si los estímulos desencadenantes, en este caso la hiperglicemia, persisten se puede llegar a un estado de estrés celular irreversible.

En el curso habitual de la UPR la activación del proceso de autofagia es una de las consecuencias principales. La autofagia es inducida por estrés de RE tanto desde la vía de PERK como la de ATF6 y actúa como mecanismo adaptativo al estrés celular (Hale AN. *et al.*, 2013). También el estrés oxidativo puede regular la activación de la autofagia, siendo por ejemplo el radical  $O_2^{\cdot -}$  un inductor del proceso de autofagia (Scherz-Shouval R. *et al.*, 2011). Las alteraciones en el proceso de autofagia pueden contribuir al desarrollo de RI puesto que, en las células  $\beta$  del páncreas, la autofagia mantiene el equilibrio entre la demanda y la síntesis y liberación de insulina en respuesta a los niveles de glucosa. Por lo tanto, no es de extrañar que en numerosos estudios se haya relacionado la presencia de una autofagia defectuosa con la fisiopatología de la DM2 (González CD. *et al.*, 2011; Masini M. *et al.*, 2009). También en la prevención de una excesiva producción de ERO intracelular, la autofagia juega un papel clave porque recicla mitocondrias defectuosas en un proceso denominado mitofagia, evitando así una situación de estrés oxidativo y la consecuente activación de la señalización proinflamatoria (Wang Y. *et al.*, 2013). Es por tanto fundamental el mantenimiento de la autofagia en el contexto de la DM2 dado que la excesiva producción de radicales libres y la inflamación crónica son características primordiales de la enfermedad.

Por tanto, nos planteamos analizar en leucocitos de un grupo de pacientes con DM2, la expresión de los marcadores de autofagia LC3-II y Beclina 1, que participan en el proceso de formación del autofagosoma. En comparación con el grupo control, estos marcadores se mostraron claramente aumentados en situación de DM2. El mantenimiento de unos niveles óptimos de autofagia en este tipo celular es muy importante puesto que participa en funciones clave como la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias o la degradación de patógenos, entre otras (Levine B. *et al.*, 2011). Sin embargo el exceso de degradación de componentes celulares mediante autofagia que observamos en los pacientes con DM2 podría indicar que estos leucocitos serían susceptibles de una muerte celular inducida por autofagia. De hecho, al analizar la morfología nuclear de estas células observamos un patrón de condensación de la cromatina acentuado en los leucocitos de pacientes diabéticos, característica del proceso de muerte celular.

La autofagia puede estar inducida por distintos estímulos como la ausencia de nutrientes, el daño oxidativo a orgánulos celulares o el estrés de RE. Sabiendo que el estrés oxidativo y el estrés de RE participan en la fisiopatología de la DM2, quisimos explorar si en nuestra población existía alguna vinculación en la regulación de estos procesos. Los niveles de Beclina 1 se correlacionan positivamente con la producción de ERO, indicando que el estrés oxidativo y la autofagia ocurrían de forma paralela. Parece ser que el exceso de ERO en estos leucocitos, así como la disfunción mitocondrial no podrían ser prevenidos por la neutralización de las mitocondrias defectuosas mediante autofagia, pese a que ésta se manifestó de forma aumentada. Este hecho podría deberse a que, cuando los leucocitos están activados, los autofagosomas capturan con preferencia otros componentes celulares en lugar de las mitocondrias (Hubbard VM. *et al.*, 2010). Asimismo hay una correlación entre Beclina 1 y LC3-II y los distintos marcadores de estrés de RE estudiados, sugiriendo que también el estrés de RE y la autofagia se incrementan simultáneamente. En este sentido, se sabe que un excesivo nivel de estrés de RE activa los mecanismos de autofagia y, también, que la homeostasis del RE y la regulación de la movilización del calcio en este orgánulo dependen precisamente de la autofagia (Ogata M. *et al.*, 2006; Jia W. *et al.*, 2011). También cabe destacar que un posible origen de las membranas que forman los autofagosomas podría ser precisamente el desprendimiento de porciones de membrana del RE (Hayashi-Nishino M. *et al.*, 2009). Por tanto, ambos procesos estarían interconectados, se complementarían y se comunicarían de forma bidireccional, participando en la fisiopatología de la DM2.

Por una parte la alteración de la funcionalidad de los leucocitos puede afectar a la función inmunitaria, alterando su capacidad de señalar y responder a ataques exógenos, y por otra, dado que este tipo celular participa en el proceso de aterosclerosis, puede modificar su comportamiento en la respuesta inflamatoria. Respecto a la posible alteración de la función inmunitaria en respuesta al estrés celular, se ha demostrado que existe una disfunción mitocondrial en linfocitos de pacientes con DM2 que los predispondría a un mayor riesgo de infecciones (Khan S. *et al.*, 2011). Por otra parte, Komura y colaboradores describieron que la función fagocitaria de los leucocitos se veía comprometida en la DM2, estando vinculada esta alteración a la situación de estrés de RE que presentaban estas células (Komura T. *et al.*, 2010). En nuestros estudios, nos propusimos valorar si el conjunto de alteraciones observadas en los leucocitos afectaba al proceso de interacción entre éstos y el endotelio, pudiendo favorecer la aparición de problemas cardiovasculares. Demostramos que el incremento en la producción de ERO mitocondriales mostró una fuerte correlación con el aumento en las interacciones leucocito-endotelio. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se demuestra que el estrés oxidativo presente en las células circulantes, como los leucocitos o las plaquetas, genera un fenotipo proinflamatorio y protrombogénico en el sistema vascular (Cooper D. *et al.*, 2002). A su vez, la disfunción mitocondrial y la liberación de radicales libres desde la mitocondria se han relacionado con el desarrollo de disfunción endotelial (Wenzel P. *et al.*, 2008). Parece que en esta inducción de disfunción endotelial por parte del estrés oxidativo participa el mecanismo de desacoplamiento de la eNOS, así como la formación de peroxinitrito en las células endoteliales y en los leucocitos, resultando en ambos casos en una disminución de la biodisponibilidad de NO (Su Y. *et al.*, 2013; Kar S. *et al.*, 2012). Además de esta consecuencia del desequilibrio redox, la excesiva producción de radicales libres promueve la activación de la señalización inflamatoria mediada principalmente por NF- $\kappa$ B, desencadenando la síntesis de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias, y favoreciendo así el reclutamiento de leucocitos hacia el endotelio vascular (Sehnert B. *et al.*, 2013). Por otra parte, estudiamos la posible relación entre la activación de las distintas rutas de la UPR con las interacciones entre leucocitos y endotelio. Los marcadores de estrés de RE en fase adaptativa GRP78 y sXBP1 mostraron una correlación negativa con la velocidad de rodamiento, sugiriendo que en esta fase los leucocitos ya empiezan a frenar sobre las paredes endoteliales. En el caso del factor proapoptótico CHOP, se observó una correlación positiva de éste con el grado de adhesión leucocitaria, indicando que la situación de estrés de RE crónico podría

favorecer que los leucocitos se adhiriesen al endotelio. Esta es la primera vez que se plantea una posible relación entre el estrés de RE y el inicio del proceso aterosclerótico en pacientes diabéticos. De forma similar a nuestros resultados, recientemente se ha descrito un aumento de algunos marcadores de estrés de RE en pacientes con enfermedad coronaria poniendo de manifiesto la importancia del estrés de RE en el sistema cardiovascular, lo cual se corresponde con nuestros resultados en pacientes diabéticos (Mozzini C. *et al.*, 2014). En conjunto estas evidencias indican que en la DM2, el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares podría estar condicionado por la alteración en la homeostasis intracelular de los leucocitos, principalmente influenciada por el control glicémico, el equilibrio redox y el plegamiento de proteínas en el RE.

En conjunto nuestras evidencias aportan un mayor conocimiento acerca de los mecanismos intracelulares que subyacen a la fisiopatología de la DM2, y que además participarían a la aparición de complicaciones en el sistema vascular. El desorden metabólico que ocurre en la DM2 se traduce en una situación de inflamación sistémica en la que participan procesos de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés de RE y autofagia en los leucocitos, propiedades que condicionan la adhesión de estas células al endotelio vascular, suponiendo un aumento del riesgo cardiovascular en estos pacientes. Numerosas moléculas participan en estos procesos y podrían ser tanto biomarcadores como dianas terapéuticas de la enfermedad, así como de las complicaciones micro- y macrovasculares que la acompañan.

## 5. CONCLUSIONS





- 5.1. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are present in the leukocytes of type 2 diabetic patients (T2D), and these features correlate with an increase in leukocyte-endothelial interactions. Furthermore, in T2D patients with silent myocardial ischemia, these abnormalities are more pronounced. These findings indicate that oxidative stress and mitochondrial dysfunction promote leukocyte-endothelium interactions and can induce the development of silent myocardial ischemia in T2D.
- 5.2. T2D patients show increased serum MPO levels that rise even further in patients with diabetic nephropathy in whom leukocyte-endothelial contact is exacerbated. These observations suggest that high amounts of MPO in serum can predispose T2D patients to developing diabetic nephropathy through a mechanism involving leukocyte-endothelial interactions.
- 5.3. There is an activation of endoplasmic reticulum (ER) stress in the leukocytes of T2D patients in response to glycemic control, with an adaptive pattern of ER stress in well controlled patients and a chronic pattern in poorly controlled patients. In circumstances of poor glycemic control, leukocytes interact more frequently with the endothelium, suggesting that ER stress regulation by glycemic control influences the adhesive properties of leukocytes and contributes to the development of cardiovascular diseases.
- 5.4. Autophagy is increased in the leukocytes of T2D patients in parallel to an increase in reactive oxygen species production and ER stress. Autophagy regulation by oxidative and ER stress can induce cell death in leukocytes during T2D.



## 6. SHORT ENGLISH VERSION



## 6.1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia and chronic low-grade inflammation. T2D is becoming a major public health issue due to its prevalence, which is increasing worldwide, and deleterious associated complications in the cardiovascular system. Obesity is the main determinant in the development of T2D. As body mass index (BMI) increases, insulin resistance develops and leads to an imbalance in glucose homeostasis.

Among the main vascular complications of T2D, cerebrovascular disease, peripheral artery disease and myocardial ischemia are macrovascular complications and represent 52% of deaths in T2D population. On the other hand, nephropathy, retinopathy and diabetic neuropathy are microvascular complications of the disease, with nephropathy being the most common, as it develops in approximately 40% of diabetic patients. Adequate glycemic control is the key to preventing these complications, as hyperglycemia is the main inducer of vascular damage.

Systemic inflammation is one of the main features of T2D and is characterized by enhanced circulatory levels of proinflammatory cytokines and chronic activation of the immune system. In the vascular wall, this inflammatory process contributes to the onset of atherosclerosis, as endothelial dysfunction, leukocyte activation and an increase in cytokines and adhesion molecules converge and promote leukocyte migration to the endothelial wall. In this context, it is interesting to study the physiopathology of T2D in peripheral blood cells such as leukocytes, since they participate in immunity and in the development of atherosclerosis, which can promote cardiovascular disease.

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction play a main role in the development of vascular complications in T2D. In fact, a growing number of studies have described different signalling pathways that connect the hyperglycaemic situation with the induction of cardiovascular diseases, in which oxidative stress is the major contributor.

Other mechanisms besides oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been related with T2D in recent years, such as endoplasmic reticulum (ER) stress and autophagy. However, less is known about how these processes participate in the physiopathology of T2D. Moreover, further research is needed to assess the relationship between the inflammatory/adhesive process in the vascular walls and

intracellular mechanisms, such as oxidative and ER stress or autophagy in leukocytes, that can eventually lead to vascular complications.

## 6.2. Objectives

In the current Doctoral Thesis we have aimed to evaluate the role of mitochondrial dysfunction in the activation of leukocytes in T2D, as well as its relationship with the interactions between leukocytes and endothelial cells, and the potential correlation among these factors and the onset of silent myocardial ischemia (SMI).

On the other hand, our goal was to assess the potential participation of myeloperoxidase (MPO) in reactive oxygen species (ROS) generation in patients with T2D, and to evaluate its potential relationship with endothelial function and the development of diabetic nephropathy.

We also decided to assess in T2D patients with different extent of glycemic control, the induction of oxidative stress and ER stress and the role of the latter in the promotion of leukocyte-endothelial interactions.

Finally, we aimed to determine whether the process of autophagy is altered in the leukocytes of T2D patients, as well as exploring its connection with oxidative and ER stress.

## 6.3. Methods

T2D patients and healthy subjects were recruited and anthropometric parameters (weight, height, BMI, waist and hip circumferences, blood pressure) and biochemical assessments (from blood samples) were determined. SMI diagnosis was confirmed by electrocardiogram and a coronary angiography test and SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography). Diabetic nephropathy was confirmed when a urinary albumin excretion over 30 mg/g creatinine was detected in T2D patients. To assess the concentration of MPO, cytokines and adhesion molecules, serum aliquots were stored at -80°C after collection. MPO concentration was determined by an ELISA immunoassay, whereas cytokines and adhesion molecules were studied by X-MAP technology in LUMINEX equipment. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, ER stress and autophagy were evaluated following isolation of peripheral blood leukocytes by Ficoll gradient. Leukocytes were incubated with the following fluorescent probes to evaluate redox balance: DCFH-DA, a marker of total ROS production; MitoSox Red, an indicator of mitochondrial ROS production; TMRM, a

marker of mitochondrial membrane potential; NAO, an indicator of mitochondrial mass; and Hoescht, a nuclear morphology probe. Fluorescence was quantified using a fluorescence microscope (IX81; Olympus) coupled to the static cytometry software “ScanR”. The mitochondrial respiration rate was assessed by a Clark-type oxygen electrode. Leukocyte-endothelial interactions were estimated using a parallel flow chamber in which leukocytes were drawn across an endothelial cell monolayer (isolated from human umbilical cords) at a controlled flow rate similar to the *in vivo* vascular system. Recordings of this process were obtained using a video camera (Sony Exware HAD) coupled to a phase contrast microscope (Nikon Eclipse TE2000-S) and finally, the processes of leukocyte rolling and adhesion were estimated. To assess the levels of ER stress and autophagy markers, the RNA and proteins from leukocytes were isolated and Real-Time PCR and Western Blotting were performed, respectively. Statistical analyses were performed by means of Graphpad Prism and SPSS software.

#### 6.4. Results and conclusions

We compared T2D patients (with at least 2 years of disease duration) with age and sex matched control subjects. T2D patients showed increases in BMI, waist circumference and blood pressure. Furthermore, they displayed increased fasting glucose and insulin levels and, therefore, an enhanced HOMA-IR index, as well as elevated HbA1c levels. A rise in triglycerides and reduced HDL content was also observed in T2D patients. The inflammatory parameters PCR, IL6 and TNF $\alpha$  were increased in the serum of T2D patients, as were the adhesion molecules E-selectin and VCAM-1. These results suggest there is an imbalanced metabolism in T2D patients, which, together with abdominal obesity, promotes a low-grade inflammatory state of metabolic origin.

As a consequence of the chronic inflammatory condition in T2D, leukocytes display diminished rolling velocity and enhanced rolling flux and adhesion over the endothelium. When these properties are increased, endothelial dysfunction is promoted and leads to the vascular damage that precedes cardiovascular diseases. One of the mechanisms that promotes this prothrombotic state in leukocytes may be oxidative stress and mitochondrial dysfunction, as our results confirm. Leukocytes from T2D patients showed enhanced ROS production, impaired antioxidant response, less mitochondrial mass, reduced membrane potential and a reduction in the oxygen consumption rate when compared to those from the control group. These features were even more pronounced in patients with SMI. At the same time, mitochondrial

ROS production was strongly correlated with the increase in leukocyte-endothelial interactions, suggesting that mitochondrial dysfunction is a determinant factor in the induction of SMI.

On the other hand, we observed a higher MPO concentration in serum from T2D patients, which was even higher in those with diabetic nephropathy. Furthermore, MPO levels correlated positively with the albumin/creatinine ratio. The interaction between leukocytes and the endothelium was more frequent in diabetic patients with nephropathy, and was accompanied by a rise in TNF $\alpha$  and E-selectin levels. These findings indicate that MPO contributes to an enhanced ROS generation in the leukocytes of T2D patients, which could have an important role in the development of diabetic nephropathy mediated by endothelial dysfunction.

Regarding the potential activation of ER stress in T2D, we observed a rise in GRP78 levels in general. However, glycemic control seemed to influence the pattern of expression of several ER stress markers, and appeared to follow an adaptive pattern in well-controlled patients and a proapoptotic pattern in poorly controlled T2D patients. Moreover, the group of poorly controlled patients displayed enhanced levels of inflammatory markers and increased rolling flux. A relationship between ER stress activation and leukocyte-endothelial interactions was apparent, since the adaptive markers GRP78 and sXBP1 were negatively correlated with rolling velocity and the proapoptotic marker CHOP was positively correlated with leukocyte adhesion. These findings indicate that, when T2D is well controlled, the velocity of leukocytes along the endothelium slows down and, when there is poor control of the disease, leukocyte adhesion is exacerbated.

Finally, we assessed the role of autophagy in T2D by determining LC3-II and Beclin1 levels in leukocytes. We detected enhanced levels of these autophagic markers together with a chromatin condensation increase that indicated ongoing cell death. The same leukocytes displayed signs of mitochondrial dysfunction, including reduced mitochondrial mass, enhanced ROS production, and increased ER stress with a rise in GRP78, p-eIF2 $\alpha$  and ATF6 levels. Furthermore, Beclin1 levels were positively associated with ROS production, while Beclin1 and LC3-II were associated with markers of ER stress. These results suggest that T2D alters autophagic function in leukocytes, and that this function is regulated in parallel with oxidative and ER stresses during T2D.



Overall, our findings reveal that mitochondrial dysfunction, oxidative stress, ER stress and autophagy occur in the leukocytes of T2D patients and potentiate the interaction between these cells and the vascular endothelium. These mechanisms may contribute to the onset of cardiovascular disease.



## 7. BIBLIOGRAFÍA



- Alom-Ruiz, S. P., Anilkumar, N., and Shah, A. M. (2008) Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxidants & redox signaling* 10(6): 1089-100.
- Amaravadi, R. K., Yu, D., Lum, J. J., Bui, T., Christophorou, M. A., Evan, G. I., Thomas-Tikhonenko, A., and Thompson, C. B. (2007) Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation* 117(2): 326-36.
- American Diabetes Association (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 35 Suppl 1: S64-71.
- Apostolova, N., Rocha, M., Rovira-Llopis, S., Banuls, C., Falcon, R., Castello, R., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V. M. (2014) Mitochondria-Targeted Antioxidants as a Therapeutic Strategy for Protecting Endothelium in Cardiovascular Diseases. *Current medicinal chemistry* 21(25): 2989-3006.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine* 11(2): 191-8.
- Aronson, D., and Rayfield, E. J. (2002) How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovascular diabetology* 1: 1.
- Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, A. M., Eiserich, J. P., Münzel, T., Simoons, M. L., and Hamm, C. W. (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108(12): 1440-5.
- Bartolome, A., Guillen, C., and Benito, M. (2012) Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic B cell death. *Autophagy* 8(12): 1757-68.
- Bastard, J. P., Maachi, M., Nhieu, J. T. van, Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., and Hainque, B. (2013) Adipose Tissue IL-6 Content Correlates with Resistance to Insulin Activation of Glucose Uptake both in Vivo and in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(5): 2084-9.
- Beckman, J. A. (2001) Inhibition of Protein Kinase Cbeta Prevents Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation Caused by Hyperglycemia in Humans. *Circulation Research* 90(1): 107-11.
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., and Lusis, A. J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91(9): 2488-96.
- Blüher, M., Unger, R., Rassoul, F., Richter, V., and 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(2): 210-6.
- Boden, G., Cheung, P., Salehi, S., Homko, C., Loveland-Jones, C., Jayarajan, S., Stein, T. P., Williams, K. J., Liu, M.-L., Barrero, C. A., and Merali, S. (2014) Insulin regulates the unfolded protein response in human adipose tissue. *Diabetes* 63(3): 912-22.
- Boden, G., Duan, X., Homko, C., Molina, E. J., Song, W., Perez, O., Cheung, P., and Merali, S. (2008) Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 57(9): 2438-44.
- Bonadonna, R. C., and DeFronzo, R. A. (1992) Glucose metabolism in obesity and type II diabetes. *Chapter 40 in OBESITY*, Brodoff A. & P.A. Bjorntorp eds., Lippincott, Philadelphia: 474-501.
- Borggreve, S. E., de Vries, R., and 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. *European Journal of Clinical Investigation* 33(12): 1051-1069.
- Boudina, S., Bugger, H., Sena, S., O'Neill, B. T., Zaha, V. G., Ilkun, O., Wright, J. J., Mazumder, P. K., Palfreyman, E., Tidwell, T. J., Theobald, H., Khalimonchuk, O., Wayment, B., Sheng, X., Rodnick, K. J., Centini, R., Chen, D., Litwin, S. E., Weimer, B. E., and Abel, E. D. (2009) Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation* 119(9): 1272-83.
- Boudina, S., Sena, S., O'Neill, B. T., Tathireddy, P., Young, M. E., and Abel, E. D. (2005) Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112(17): 2686-95.
- Brash, A. R. (1999) Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 274(34): 23679-82.
- Brookes, P. S., Levonen, A.L., Shiva, S., Sarti, P., and Darley-Usmar, V. M. (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology & Medicine* 33(6): 755-64.
- Brown, D. I., and Griendling, K. K. (2015) Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research* 116(3): 531-49.

- Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-20.
- Brownlee, M. (2005) The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-25.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine* 11(2): 183-90.
- Cai, L., Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., and Kang, Y. J. (2002) Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Mouse Myocardium: Mitochondrial Cytochrome c-Mediated Caspase-3 Activation Pathway. *Diabetes* 51(6): 1938-48.
- Cakatay, U. (2005) Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes & metabolism* 31(6): 551-7.
- Carlos, T. M., and Harlan, J. M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84(7): 2068-101.
- Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D. J., Walker, S., and Shah, A. M. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 8(5-6): 691-728.
- Chen, Y., Azad, M. B., and Gibson, S. B. (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation* 16(7): 1040-52.
- Cheng, X., Siow, R. C. M., and 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. *Antioxidants & redox signaling* 14(3): 469-87.
- Civelek, M., Manduchi, E., Riley, R. J., Stoeckert, C. J., and Davies, P. F. (2009) Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circulation research* 105(5): 453-61.
- Cohn, P. F., Fox, K. M., and Daly, C. (2003) Silent myocardial ischemia. *Circulation* 108(10): 1263-77.
- Conget, I., and Giménez, M. (2009) Glucose control and cardiovascular disease: is it important? No. *Diabetes care* 32 Suppl 2: S334-6.
- Conti, C. R., Bavry, A. A., and Petersen, J. W. (2012) Silent ischemia: Clinical relevance. *Journal of the American College of Cardiology* 59: 435-41.

- Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E., and Abdala-Valencia, H. (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling* 15(6): 1607-38.
- Cooper, D., Stokes, K. Y., Taylor, A., and Granger, D. N. (2002) Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovascular toxicology* 2(3): 165-80.
- 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., and Forbes, J. M. (2009) RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 20(4):742-52.
- 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., Furlanos, S., Groop, P. H., Harrison, L. C., Knip, M., and Forbes, J. M. (2011) Advanced glycation end products are direct modulators of B-cell function. *Diabetes* 60(10): 2523-32.
- Croston, T. L., Thapa, D., Holden, A. A., Tveter, K. J., Lewis, S. E., Shepherd, D. L., Nichols, C. E., Long, D. M., Olfert, I. M., Jagannathan, R., and Hollander, J. M. (2014) Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 307(1): H54-65.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., and Diehl, J. A. (2003) Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology* 23(20): 7198-209.
- Dahm, C. C., Moore, K., and Murphy, M. P. (2006) Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 281(15): 10056-65.
- Dansky, H. M., Barlow, C. B., Lominska, C., Sikes, J. L., Kao, C., Weinsaft, J., Cybulsky, M. I., and 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21(10): 1662-7.
- Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., and Schootman, M. (2008) Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Physical therapy* 88(11): 1254-64.



- Desrois, M. (2004) Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular Research* 61(2): 288-96.
- Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Moreno, N. R., García-Rios, A., Delgado-Casado, N., Membrives, A., Túnez, I., El Bekay, R., Fernández-Real, J. M., Tovar, S., Diéguez, C., Tinahones, F. J., Vázquez-Martínez, R., López-Miranda, J., and Malagón, M. M. (2015) Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxidants & redox signaling* 23(7):597-612.
- Drechsler, M., Duchene, J., and Soehnlein, O. (2015) Chemokines control mobilization, recruitment, and fate of monocytes in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35(5): 1050-5.
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82(1): 47-95.
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., and Watada, H. (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell metabolism* 8(4): 325-32.
- Eiserich, J. P., Baldus, S., Brennan, M. L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Luscis, A. J., Nauseef, W. M., White, C. R., and Freeman, B. A. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296(5577): 2391-4.
- Elston, T., Wang, H., and Oster, G. (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391(6666): 510-3.
- Erbay, E., Babaev, V. R., Mayers, J. R., Makowski, L., Charles, K. N., Snitow, M. E., Fazio, S., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Linton, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2009) Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature medicine* 15(12): 1383-91.
- Esteghamati, A., Eskandari, D., Mirmiranpour, H., Noshad, S., Mousavizadeh, M., Hedayati, M., and Nakhjavani, M. (2013) Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition* 32(2): 179-85.
- Exner, M., Minar, E., Mlekusch, W., Sabeti, S., Amighi, J., Lalouschek, W., Maurer, G., Biegelmayer, C., Kieweg, H., Wagner, O., and Schillinger, M. (2006) Myeloperoxidase predicts progression of carotid stenosis in states of low high-density lipoprotein cholesterol. *Journal of the American College of Cardiology* 47(11): 2212-8.

- Faden, G., Faganello, G., De Feo, S., Berlinghieri, N., Tarantini, L., Di Lenarda, A., Faggiano, P., and Cioffi, G. (2013) The increasing detection of asymptomatic left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus without overt cardiac disease: data from the SHORTWAVE study. *Diabetes research and clinical practice* 101(3): 309-16.
- Félétou, M., and Vanhoutte, P. M. (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291(3), H985-1002.
- Festa, A., D'Agostino, R., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R. P., and Haffner, S. M. (2000) Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance Syndrome: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102(1): 42-47.
- Forbes, J. M., and Cooper, M. E. (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews* 93(1): 137-88.
- Gahmberg, C. G., Valmu, L., Fagerholm, S., Kotovuori, P., Ihanus, E., Tian, L., and Pessa-Morikawa, T. (1998) Leukocyte integrins and inflammation. *Cellular and molecular life sciences* 54(6): 549-55.
- Geiszt, M., and Leto, T. L. (2004) The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *The Journal of biological chemistry* 279(50): 51715-8.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16: 225-60.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F., and Pelicci, P. G. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122(2): 221-33.
- Giulietti, A., van Etten, E., Overbergh, L., Stoffels, K., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2007) Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes research and clinical practice* 77(1): 47-57.
- Goetz, D. J., Greif, D. M., Shen, J., and Lusinskas, F. W. (1999) Cell-cell adhesive interactions in an in vitro flow chamber. *Methods in molecular biology* 96: 137-45.

- Gonzalez, C. D., Lee, M. S., Marchetti, P., Pietropaolo, M., Towns, R., Vaccaro, M. I., Watada, H., and Wiley, J. W. (2011) The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* 7(1): 2-11.
- Gorin, Y., and Block, K. (2013) Nox as a target for diabetic complications. *Clinical science* 125(8): 361-82.
- Gorin, Y., Block, K., Hernandez, J., Bhandari, B., Wagner, B., Barnes, J. L., and Abboud, H. E. (2005) Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *The Journal of biological chemistry* 280(47): 39616-26.
- Görlach, A., Klappa, P., and Kietzmann, T. (2006) The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants & redox signaling* 8(9-10): 1391-418.
- Gregor, M. F., Yang, L., Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Eagon, J. C., Hotamisligil, G. S., and Klein, S. (2009) Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58(3): 693-700.
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., and Shaw, J. E. (2014) Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice* 103(2): 137-49.
- Gurgul, E., Lortz, S., Tiedge, M., Jorns, A., and Lenzen, S. (2004) Mitochondrial Catalase Overexpression Protects Insulin-Producing Cells Against Toxicity of Reactive Oxygen Species and Proinflammatory Cytokines. *Diabetes* 53(9): 2271-80.
- Haffner, S. M., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K., and Laakso, M. (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 339(4): 229-34.
- Haines, T. H., and Dencher, N. A. (2002) Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters* 528(1-3): 35-9.
- Hale, A. N., Ledbetter, D. J., Gawriluk, T. R., and Rucker, E. B. (2013) Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy* 9(7): 951-72.
- Harris, T. B., Ferrucci, L., Tracy, R. P., Corti, M. C., Wacholder, S., Ettinger, W. H., Heimovitz, H., Cohen, H. J., and Wallace, R. (1999) Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *The American journal of medicine* 106(5): 506-12.
- Hartman, M. L., Shirihai, O. S., Holbrook, M., Xu, G., Kocherla, M., Shah, A., Fetterman, J. L., Kluge, M. A., Frame, A. A., Hamburg, N. M., and Vita, J. A.

- (2014) Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus. *Vascular medicine* 19(1): 67-74.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology* 11(12): 1433-7.
- Haynes, C. M., Titus, E. A., and Cooper, A. A. (2004) Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Molecular Cell* 15(5): 767-76.
- Hayward, R. A., Reaven, P. D., Wiitala, W. L., Bahn, G. D., Reda, D. J., Ge, L., McCarren, M., Duckworth, W. C., and Emanuele, N. V (2015) Follow-up of Glycemic Control and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 372(23): 2197-206.
- Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., Apostolova, N., Borrás, C., Jover, A., Bañuls, C., Sola, E., and Victor, V. M. (2011) Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free radical biology & medicine* 50(10): 1215-21.
- Hey-Mogensen, M., Højlund, K., Vind, B. F., Wang, L., Dela, F., Beck-Nielsen, H., Fernström, M., and Sahlin, K. (2010) Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 53(9): 1976-85.
- Higa, A., and Chevet, E. (2012) Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cellular signalling* 24(8): 1548-55.
- Holmström, M. H., Iglesias-Gutierrez, E., Zierath, J. R., and Garcia-Roves, P. M. (2012) Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302(6): E731-9.
- Hope, S. A., and Meredith, I. T. (2003) Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part II. Their association with conventional and emerging risk factors, acute coronary events and cardiovascular risk prediction. *Internal medicine journal* 33(9-10): 450-62.
- Hotamisligil, G. S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140(6): 900-17.
- Hotamisligil, G., Shargill, N., and Spiegelman, B. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091): 87-91.

- Houstis, N., Rosen, E. D., and Lander, E. S. (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440(7086): 944-8.
- Hubbard, V. M., Valdor, R., Patel, B., Singh, R., Cuervo, A. M., and Macian, F. (2010) Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *Journal of immunology* 185(12): 7349-57.
- Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H., and Reusch, J. E. B. (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes care* 29(6): 1420-32.
- Huynh, K., Kiriazis, H., Du, X. J., Love, J. E., Jandeleit-Dahm, K. A., Forbes, J. M., McMullen, J. R., and Ritchie, R. H. (2012) Coenzyme Q10 attenuates diastolic dysfunction, cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 55(5): 1544-53.
- 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., and 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(11): 1939-45.
- Jansen, H. J., van Essen, P., Koenen, T., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., Tack, C. J., and Stienstra, R. (2012) Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 153(12): 5866-74.
- Jefferson, J. A., Shankland, S. J., and Pichler, R. H. (2008) Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney international* 74(1): 22-36.
- Jeong, Y. T., Kim, Y. D., Jung, Y. M., Park, D. C., Lee, D. S., Ku, S. K., Li, X., Lu, Y., Chao, G. H., Kim, K. J., Lee, J. Y., Baek, M. C., Kang, W., Hwang, S. L., and Chang, H. W. (2013) Low molecular weight fucoidan improves endoplasmic reticulum stress-reduced insulin sensitivity through AMP-activated protein kinase activation in L6 myotubes and restores lipid homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Molecular pharmacology* 84(1): 147-57.
- Jia, W., Pua, H. H., Li, Q. J., and He, Y. W. (2011) Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes. *Journal of immunology* 186(3): 1564-74.
- Jung, H. S., Chung, K. W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y. H., Kang, T. M., Yoon, K. H., Kim, J. W., Jeong, Y. T., Han, M. S., Lee, M. K., Kim, K. W., Shin, J., and Lee, M. S. (2008) Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell metabolism* 8(4): 318-24.

- Kahn, S. E., Hull, R. L., and Utzschneider, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121): 840-6.
- Kaniuk, N. A., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A., and Brumell, J. H. (2007) Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* 56(4): 930-9.
- 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., Barr, E. L., 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. Sr., Dankner, R., Davey-Smith, G., Deeg, D., Dekker, J. M., Engström, G., Folsom, A. R., Fowkes, F. G., 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., Strandberg, T. E., Tipping, R. W., Tostetto, A., Wassertheil-Smoller, S., Wennberg, P., Westendorp, R.G., Whincup, P. H., Wilhelmsen, L., Woodward, M., Lowe, G. D., 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. *The New England journal of medicine* 367(14): 1310-20.
- Kar, S., and Kavdia, M. (2012) Local oxidative and nitrosative stress increases in the microcirculation during leukocytes-endothelial cell interactions. *PLoS one* 7(6): e38912.
- Kataoka, Y., Shao, M., Wolski, K., Uno, K., Puri, R., Murat Tuzcu, E., Hazen, S. L., Nissen, S. E., and Nicholls, S. J. (2014) Myeloperoxidase levels predict accelerated progression of coronary atherosclerosis in diabetic patients: insights from intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 232(2): 377-83.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2012) Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific reports* 2: 799.
- Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V., and Ritov, V. B. (2002) Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51(10): 2944-2950.

- Kelley, E. E., Khoo, N. K. H., Hundley, N. J., Malik, U. Z., Freeman, B. A., and Tarpey, M. M. (2010) Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free radical biology & medicine* 48(4): 493-8.
- Khan, S., Raghuram, G. V, Bhargava, A., Pathak, N., Chandra, D. H., Jain, S. K., and Mishra, P. K. (2011) Role and clinical significance of lymphocyte mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Translational Research* 158(6): 344-59.
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U., and Cuervo, A. M. (2006) Oxidative Stress and Autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling* 8(1-2):152-62.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports* 2(4): 330-5.
- Kizhakekuttu, T. J., Wang, J., Dharmashankar, K., Ying, R., Gutterman, D. D., Vita, J. A., and Widlansky, M. E. (2012) Adverse alterations in mitochondrial function contribute to type 2 diabetes mellitus-related endothelial dysfunction in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(10): 2531-9.
- Klebanoff, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 77(5): 598-625.
- Klinke, A., Nussbaum, C., Kubala, L., Friedrichs, K., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Paust, H. J., Schröder, C., Benten, D., Lau, D., Szocs, K., Furtmüller, P. G., Heeringa, P., Sydow, K., Duchstein, H. J., Ehmke, H., Schumacher, U., Meinertz, T., Sperandio, M., Baldus, S. (2011) Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* 117(4): 1350-8.
- Komura, T., Sakai, Y., Honda, M., Takamura, T., Matsushima, K., and Kaneko, S. (2010) CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59(3): 634-43.
- Krauss, R. M. (2004) Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 27(6): 1496-504.
- Kruse, R., Vind, B. F., Petersson, S. J., Kristensen, J. M., and Højlund, K. (2015) Markers of autophagy are adapted to hyperglycaemia in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetologia* 58(9): 2087-95.
- Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D. N. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(11): 4651-5.

- Kumar, D., Nath, L., Kamal, M. A., Varshney, A., Jain, A., Singh, S., and Rao, K. V. S. (2010) Genome-wide Analysis of the Host Intracellular Network that Regulates Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 140(5): 731-43.
- Laakso, M., and Kuusisto, J. (2014) Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nature reviews Endocrinology* 10(5): 293-302.
- Lanza, F. (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of molecular medicine* 76(10): 676-81.
- Lee, A. H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., and Glimcher, L. H. (2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320(5882): 1492-6.
- Legisamo, N. M., Lehnen, A. M., Machado, U. F., Okamoto, M. M., Markoski, M. M., Pinto, G. H., and Schaan, B. D. (2012) GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovascular diabetology* 11: 100.
- Leick, M., Azcutia, V., Newton, G., and Luscinskas, F. W. (2014) Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell and tissue research* 355(3): 647-56.
- Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A. L., Ktorza, A., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58(3): 673-81.
- Lerner, A. G., Upton, J. P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S. A., and Papa, F.R. (2012) IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metabolism* 16(2): 250-64.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H. W. (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469(7330): 323-35.
- Li, B., Wang, H. S., Li, G. G., Zhao, M. J., and Zhao, M. H. (2009) The role of endoplasmic reticulum stress in the early stage of diabetic retinopathy. *Acta Diabetologica* 48(2): 103-11.
- Libby, P. (2006) Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The american journal of clinical nutrition* 83(2): 456S-460.



- Liu, H. Y., Han, J., Cao, S. Y., Hong, T., Zhuo, D., Shi, J., Liu, Z., and Cao, W. (2009) Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *The Journal of biological chemistry* 284(45): 31484-92.
- Lowe, G., Woodward, M., Hillis, G., Rumley, A., Li, Q., Harrap, S., Marre, M., Hamet, P., Patel, A., Poulter, N., and 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(3): 1115-23.
- Martin, L. J. (2012) Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Progress in molecular biology and translational science* 107: 355-415.
- Martina, V., Masha, A., Gigliardi, V. R., Brocato, L., Manzato, E., Berchio, A., Massarenti, P., Settanni, F., Della Casa, L., Bergamini, S., and Iannone, A. (2008) Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 31(5): 940-4.
- Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., del Guerra, S., Boggi, U., Filipponi, F., Marselli, L., Masiello, P., and Marchetti, P. (2009) Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* 52(6): 1083-6.
- Mazzone, T., Chait, A., and Plutzky, J. (2008) Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *The lancet* 371(9626): 1800-9.
- Meigs, J. B., Hu, F. B., Rifai, N., and Manson, J. E. (2004) Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 291(16): 1978-86.
- Mikhed, Y., Daiber, A., and Steven, S. (2015) Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *International journal of molecular sciences* 16(7): 15918-53.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes & Development* 21(22): 2861-73.
- Mocatta, T. J., Pilbrow, A. P., Cameron, V. A., Senthilmohan, R., Frampton, C. M., Richards, A. M., and Winterbourn, C. C. (2007) Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 49(20): 1993-2000.
- Mogensen, M., Sahlin, K., Fernström, M., Glinborg, D., Vind, B. F., Beck-Nielsen, H., and Højlund, K. (2007) Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56(6): 1592-9.

- Montero, D., Walther, G., Stehouwer, C. D. A., Houben, A. J. H. M., Beckman, J. A., and 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. *Obesity reviews* 15(2): 107-16.
- Mooradian, A. D. (2009) Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 5(3): 150-9.
- Mooradian, A. D., and Haas, M. J. (2011) Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes. *Free Radical Biology & Medicine* 50(9): 1140-3.
- Moreno, P. R., Murcia, A. M., Palacios, I. F., Leon, M. N., Bernardi, V. H., Fuster, V., and Fallon, J. T. (2000) Coronary Composition and Macrophage Infiltration in Atherectomy Specimens From Patients With Diabetes Mellitus. *Circulation* 102(18): 2180-4.
- Morrish, N. J., Wang, S. L., Stevens, L. K., Fuller, J. H., and Keen, H. (2001) Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44 Suppl 2: S14-21.
- Mostaza, J. M., Lahoz, C., Salinero-Fort, M. A., de Burgos-Lunar, C., Laguna, F., Estirado, E., García-Iglesias, F., González-Alegre, T., Cornejo-Del-Río, V., Sabín, C., and López, S. (2015) Carotid atherosclerosis severity in relation to glycemic status: A cross-sectional population study. *Atherosclerosis* 242(2): 377-82.
- Mozzini, C., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Stranieri, C., Pasini, A., Vallerio, P., and Cominacini, L. (2014) Increased endoplasmic reticulum stress and Nrf2 repression in peripheral blood mononuclear cells of patients with stable coronary artery disease. *Free Radical Biology & Medicine* 68: 178-85.
- Musatov, A., and Robinson, N. C. (2012) Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free radical research* 46(11): 1313-26.
- Myoishi, M., Hao, H., Minamino, T., Watanabe, K., Nishihira, K., Hatakeyama, K., Asada, Y., Okada, K., Ishibashi-Ueda, H., Gabbiani, G., Bochaton-Piallat, M. L., Mochizuki, N., and Kitakaze, M. (2007) Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116(11): 1226-33.
- Naka, M., Hiramatsu, K., Aizawa, T., Momose, A., Yoshizawa, K., Shigematsu, S., Ishihara, F., Niwa, A., and Yamada, T. (1992) Silent myocardial ischemia in

- patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus as judged by treadmill exercise testing and coronary angiography. *American heart journal* 123: 46-53.
- Navarro-González, J. F., Mora-Fernández, C., Muros de Fuentes, M., and García-Pérez, J. (2011) Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature reviews Nephrology* 7(6): 327-40.
- Nicholls, S. J., Zheng, L., and Hazen, S. L. (2005) Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends in cardiovascular medicine* 15(6): 212-9.
- 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., and Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779): 787-90.
- O'Brien, K. D., Allen, M. D., McDonald, T. O., Chait, A., Harlan, J. M., Fishbein, D., McCarty, J., Ferguson, M., Hudkins, K., and Benjamin, C. D. (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 92(2): 945-51.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F., and Imaizumi, K. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* 26(24): 9220-31.
- Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., Yutani, C., Ozawa, K., Ogawa, S., Tomoike, H., Hori, M., and Kitakaze, M. (2004) Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110(6): 705-12.
- Ost, A., Svensson, K., Ruishalme, I., Brännmark, C., Franck, N., Krook, H., Sandström, P., Kjolhede, P., and Strålfors, P. (2010) Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Molecular medicine* 16(7-8): 235-46.
- Otoda, T., Takamura, T., Misu, H., Ota, T., Murata, S., Hayashi, H., Takayama, H., Kikuchi, A., Kanamori, T., Shima, K. R., Lan, F., Takeda, T., Kurita, S., Ishikura, K., Kita, Y., Iwayama, K., Kato, K., Uno, M., Takeshita, Y., Yamamoto, M., Tokuyama, K., Iseki, S., Tanaka, K., Kaneko, S. (2013) Proteasome dysfunction

- mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes* 62(3): 811-24.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306(5695): 457-61.
- Pagnin, E., Fadini, G., de Toni, R., Tiengo, A., Calò, L., and Avogaro, A. (2005) Diabetes induces p66shc gene expression in human peripheral blood mononuclear cells: relationship to oxidative stress. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(2): 1130-6.
- Patti, M. E., and Corvera, S. (2010) The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews* 31(3): 364-95.
- Pearson, T. A. (2003) Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107(3): 499-511.
- Perry, C. G. R., Kane, D. A., Lanza, I. R., and Neuffer, P. D. (2013) Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes* 62(4): 1041-53.
- Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2006) Etiology of insulin resistance. *The American journal of medicine* 119(5 Suppl 1): S10-6.
- Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D., and Burt, D. (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40(11): 1286-92.
- Pitanga, T. N., de Aragão França, L., Rocha, V. C. J., Meirelles, T., Borges, V. M., Gonçalves, M. S., Pontes-de-Carvalho, L. C., Noronha-Dutra, A. A., and dos Santos, W. L. C. (2014) Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC cell biology* 15: 21.
- Pyörälä, K., Pedersen, T. R., Kjekshus, J., Faergeman, O., Olsson, A. G., and 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(4): 614-20.
- Quan, W., Hur, K. Y., Lim, Y., Oh, S. H., Lee, J. C., Kim, K. H., Kim, G. H., Kim, S. W., Kim, H. L., Lee, M. K., Kim, K. W., Kim, J., Komatsu, M., and Lee, M. S. (2012) Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein

- response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* 55(2): 392-403.
- Rabøl, R., Højberg, P. M. V., Almdal, T., Boushel, R., Haugaard, S. B., Madsbad, S., and Dela, F. (2009) Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(4): 1372-8.
- Rahman, M., Mofarrahi, M., Kristof, A. S., Nkengfac, B., Harel, S., and Hussain, S. N. A. (2014) Reactive oxygen species regulation of autophagy in skeletal muscles. *Antioxidants & redox signaling* 20(3): 443-59.
- Raman, R., Gupta, A., Krishna, S., Kulothungan, V., and Sharma, T. (2012) Prevalence and risk factors for diabetic microvascular complications in newly diagnosed type II diabetes mellitus. Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetic Study (SN-DREAMS, report 27). *Journal of Diabetes and its Complications* 26: 123-8.
- Raygan, F., Rezavandi, Z., Dadkhah Tehrani, S., Farrokhian, A., and Asemi, Z. (2015) The effects of coenzyme Q10 administration on glucose homeostasis parameters, lipid profiles, biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition*. [Epub ahead of print]
- Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., and Braunwald, E. (2000) Elevation of Tumor Necrosis Factor- alpha and Increased Risk of Recurrent Coronary Events After Myocardial Infarction. *Circulation* 101(18): 2149-53.
- Rizzo, M. R., Barbieri, M., Marfella, R., and Paolisso, G. (2012) Reduction of Oxidative Stress and Inflammation by Blunting Daily Acute Glucose Fluctuations in Patients With Type 2 Diabetes: Role of dipeptidyl peptidase-IV inhibition. *Diabetes Care* 35(10): 2076-82.
- Rocha, M., Rovira-Llopis, S., and Víctor, V. M. (2014) Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y enfermedad cardiometabólica. In A. Hernández Mijares, C. Morillas Ariño (Eds.), *Guías Clín*, pp. 413-422. Laboratorios Esteve, S.A.
- Roe, N. D., Thomas, D. P., and Ren, J. (2011) Inhibition of NADPH oxidase alleviates experimental diabetes-induced myocardial contractile dysfunction. *Diabetes, obesity & metabolism* 13(5): 465-73.
- Roglic, G., Unwin, N., Bennett, P. H., Mathers, C., Tuomilehto, J., Nag, S., Connolly, V., and King, H. (2005) The burden of mortality attributable to diabetes: Realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* 28: 2130-5.
- Rossing, K., Christensen, P. K., Hovind, P., Tarnow, L., Rossing, P., and Parving, H. H. (2004) Progression of nephropathy in type 2 diabetic patients. *Kidney international* 66(4): 1596-605.

- Rui, L., Aguirre, V., Kim, J. K., Shulman, G. I., Lee, A., Corbould, A., Dunaif, A., and White, M. F. (2001) Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *The Journal of clinical investigation* 107(2): 181-9.
- Rytter, E., Vessby, B., Asgård, R., Johansson, C., Sjödin, A., Abramsson-Zetterberg, L., Möller, L., and Basu, S. (2009) Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *The British journal of nutrition* 101(10): 1423-6.
- Sage, A. T., Holtby-Ottenhof, S., Shi, Y., Damjanovic, S., Sharma, A. M., and Werstuck, G. H. (2012) Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)* 20(4): 748-55.
- Sanson, M., Augé, N., Vindis, C., Muller, C., Bando, Y., Thiers, J. C., Marachet, M. A., Zarkovic, K., Sawa, Y., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2009) Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circulation research* 104(3): 328-36.
- Sasso, F. C., Chiodini, P., Carbonara, O., De Nicola, L., Conte, G., Salvatore, T., Nasti, R., Marfella, R., Gallo, C., Signoriello, S., Torella, R., and Minutolo, R. (2011) High cardiovascular risk in patients with Type 2 diabetic nephropathy: the predictive role of albuminuria and glomerular filtration rate. The NID-2 Prospective Cohort Study. *Nephrology Dialysis Transplantation* 27(6): 2269-74.
- Satirapoj, B., and Adler, S. G. (2014) Comprehensive approach to diabetic nephropathy. *Kidney Research and Clinical Practice* 33(3): 121-31.
- Sato, N., Kashima, K., Tanaka, Y., Shimizu, H., and Mori, M. (1997) Effect of granulocyte-colony stimulating factor on generation of oxygen-derived free radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. *Diabetes* 46(1): 133-7.
- Schaffer, S. W., Jong, C. J., and Mozaffari, M. (2012) Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascular pharmacology* 57(5-6): 139-49.
- 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., and Malle, E. (2014) Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular mortality in individuals undergoing coronary angiography--the LURIC study. *International journal of cardiology* 174(1): 96-105.

- Scheidt-Nave, C., Barrett-Connor, E., and Wingard, D. L. (1990) Resting electrocardiographic abnormalities suggestive of asymptomatic ischemic heart disease associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus in a defined population. *Circulation* 81: 899-906.
- Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in biochemical sciences* 36(1): 30-8.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal* 26(7): 1749-60.
- Scheuermann-Freestone, M. (2003) Abnormal Cardiac and Skeletal Muscle Energy Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes. *Circulation* 107(24): 3040-6.
- Schindhelm, R. K., Alsema, M., Diamant, M., Teerlink, T., Dekker, J. M., Kok, A., Kostense, P. J., Nijpels, G., Heine, R. J., and Scheffer, P. G. (2008) Comparison of two consecutive fat-rich and carbohydrate-rich meals on postprandial myeloperoxidase response in women with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental* 57(2): 262-7.
- Schnoor, M. (2015) Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *Journal of Immunology* 194(8): 3535-41.
- Schramm, T. K., Gislason, G. H., Køber, L., Rasmussen, S., Rasmussen, J. N., Abildstrøm, S. Z., Hansen, M. L., Folke, F., Buch, P., Madsen, M., Vaag, A., and Torp-Pedersen, C. (2008) Diabetes patients requiring glucose-lowering therapy and nondiabetics with a prior myocardial infarction carry the same cardiovascular risk: A population study of 3.3 million people. *Circulation* 117: 1945-54.
- Schulze, P. C., Yoshioka, J., Takahashi, T., He, Z., King, G. L., and Lee, R. T. (2004) Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *The Journal of biological chemistry* 279(29): 30369-74.
- Segal, A. W., and Shatwell, K. P. (1997) The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 832: 215-22.
- Sehnert, B., Burkhardt, H., Wessels, J. T., Schroder, A., May, M. J., Vestweber, D., Zwerina, J., Warnatz, K., Nimmerjahn, F., Schett, G., Dubel, S., and Voll, R. E. (2013) NF-κB inhibitor targeted to activated endothelium demonstrates a critical role of endothelial NF-κB in immune-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(41): 16556-61.

- Sena, S., Hu, P., Zhang, D., Wang, X., Wayment, B., Olsen, C., Avelar, E., Abel, E. D., and Litwin, S. E. (2009) Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46(6): 910-8.
- Seo, J., Fortunato, E. S., Suh, J. M., Stenesen, D., Tang, W., Parks, E. J., Adams, C. M., Townes, T., and Graff, J. M. (2009) Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes* 58(11): 2565-73.
- Shah, A. D., Langenberg, C., Rapsomaniki, E., Denaxas, S., Pujades-Rodriguez, M., Gale, C. P., Deanfield, J., Smeeth, L., Timmis, A., and Hemingway, H. (2015) Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *The lancet Diabetes & endocrinology* 3(2): 105-13.
- Shao, B., Oda, M. N., Bergt, C., Fu, X., Green, P. S., Brot, N., Oram, J. F., and Heinecke, J. W. (2006) Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *The Journal of biological chemistry* 281(14): 9001-4.
- Shenouda, S. M., Widlansky, M. E., Chen, K., Xu, G., Holbrook, M., Tabit, C. E., Hamburg, N. M., Frame, A. A., Caiano, T. L., Kluge, M. A., Duess, M. A., Levit, A., Kim, B., Hartman, M. L., Joseph, L., Shirihai, O. S., and Vita, J. A. (2011) Altered Mitochondrial Dynamics Contributes to Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circulation* 124(4) 444-53.
- Skulachev, V. P. (2013) Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications* 441(2): 275-9.
- Sourris, K. C., Lyons, J. G., de Courten, M. P. J., Dougherty, S. L., Henstridge, D. C., Cooper, M. E., Hage, M., Dart, A., Kingwell, B. A., Forbes, J. M., and de Courten, B. (2009) c-Jun NH2-terminal kinase activity in subcutaneous adipose tissue but not nuclear factor-kappaB activity in peripheral blood mononuclear cells is an independent determinant of insulin resistance in healthy individuals. *Diabetes* 58(6): 1259-65.
- Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C., and Holman, R. R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321(7258), 405-12.
- Stephens, J. M., Lee, J., and Pilch, P. F. (1997) Tumor Necrosis Factor-alpha-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin



- Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* 272(2): 971-6.
- Strobel, N. A., Fassett, R. G., Marsh, S. A., and Coombes, J. S. (2011) Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *International journal of cardiology* 147(2): 191-201.
- Su, Y., Qadri, S. M., Hossain, M., Wu, L., and Liu, L. (2013) Uncoupling of eNOS contributes to redox-sensitive leukocyte recruitment and microvascular leakage elicited by methylglyoxal. *Biochemical pharmacology* 86(12): 1762-74.
- Sugamura, K., and Keaney, J. F. (2011) Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine* 51(5): 978-92.
- Tabas, I. (2010) Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews. Immunology* 10(1): 36-46.
- Tang, W. H., Katz, R., Brennan, M. L., Aviles, R. J., Tracy, R. P., Psaty, B. M., and Hazen, S. L. (2009) Usefulness of myeloperoxidase levels in healthy elderly subjects to predict risk of developing heart failure. *The American journal of cardiology* 103(9): 1269-74.
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2005) Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1(2): 84-91.
- Tousoulis, D., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Siasos, G., Latsios, G., Tentolouris, K., and Stefanadis, C. (2013) Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *Journal of the American College of Cardiology* 62(8): 667-76.
- Twig, G., Afek, A., Derazne, E., Tzur, D., Cukierman-Yaffe, T., Gerstein, H. C., and Tirosh, A. (2014) Diabetes risk among overweight and obese metabolically healthy young adults. *Diabetes care* 37(11): 2989-95.
- Uchimura, K., Nagasaka, A., Hayashi, R., Makino, M., Nagata, M., Kakizawa, H., Kobayashi, T., Fujiwara, K., Kato, T., Iwase, K., Shinohara, R., Kato, K., and Itoh, M. (1999) Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications* 13(5-6): 264-70.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet* 352(9131): 837-53.

- Urakawa, H., Katsuki, A., Sumida, Y., Gabazza, E. C., Murashima, S., Morioka, K., Maruyama, N., Kitagawa, N., Tanaka, T., Hori, Y., Nakatani, K., Yano, Y., and Adachi, Y. (2003) Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(10): 4673-6.
- Uribarri, J., Cai, W., Ramdas, M., Goodman, S., Pyzik, R., Chen, X., Zhu, L., Striker, G. E., and Vlassara, H. (2011) Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes care* 34(7): 1610-6.
- Utrecht, G. A., Taylor, D., and Statements, P. (2012) Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care* 35 Suppl 1: S11-63.
- Victor, V. M., Rocha, M., Herance, R., and Hernandez-Mijares, A. (2011) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Current Pharmaceutical Design* 17(36): 3947-58.
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* 122(6): 253-70.
- Vita, J. A., Brennan, M. L., Gokce, N., Mann, S. A., Goormastic, M., Shishehbor, M. H., Penn, M. S., Keaney, J. F., and Hazen, S. L. (2004) Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 110(9): 1134-9.
- Vojarova, B., Weyer, C., Lindsay, R. S., Pratley, R. E., Bogardus, C., and 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(2): 455-61.
- Wang, D., Wei, Y., Schmoll, D., Maclean, K. N., and Pagliassotti, M. J. (2006) Endoplasmic reticulum stress increases glucose-6-phosphatase and glucose cycling in liver cells. *Endocrinology* 147(1): 350-8.
- Wang, Y., Li, Y., Yin, J., Wang, Y., Zhu, L., Xie, G., and Pan, S. (2013) Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes. *Autophagy* 9(3): 272-7.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112(12): 1796-808.
- Wellen, K. E., and Hotamisligil, G. S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* 115(5): 1111-9.

- Wenzel, P., Schuhmacher, S., Kienhöfer, J., Müller, J., Hortmann, M., Oelze, M., Schulz, E., Treiber, N., Kawamoto, T., Scharffetter-Kochanek, K., Münzel, T., Bürkle, A., Bachschmid, M. M., and Daiber, A. (2008) Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovascular research* 80(2): 280-9.
- Widlansky, M. E., Wang, J., Shenouda, S. M., Hagen, T. M., Smith, A. R., Kizhakekuttu, T. J., Kluge, M. A., Weihrauch, D., Guterman, D. D., and Vita, J. A. (2010) Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Translational Research* 156(1): 15-25.
- Wiersma, J. J., Meuwese, M. C., van Miert, J. N. I., Kastelein, A., Tijssen, J. G. P., Piek, J. J., and Trip, M. D. (2008) Diabetes mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase. *Medical science monitor* 14(8): CR406-10.
- Winterbourn, C. C., and Kettle, A. J. (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine* 29(5): 403-9.
- Wu, C. C., and Bratton, S. B. (2013) Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling* 19(6): 546-58.
- Wu, J., Zhang, R., Torreggiani, M., Ting, A., Xiong, H., Striker, G. E., Vlassara, H., and Zheng, F. (2010) Induction of diabetes in aged C57B6 mice results in severe nephropathy: an association with oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and inflammation. *The American journal of pathology* 176(5): 2163-76.
- Xie, Z., and Klionsky, D. J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* 9(10): 1102-9.
- Xu, B., Moritz, J. T., and Epstein, P. N. (1999) Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free radical biology & medicine* 27(7-8): 830-7.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 112(12): 1821-30.
- Yadav, D., Mishra, M., Joseph, A. Z., Subramani, S. K., Mahajan, S., Singh, N., Bisen, P. S., and Prasad, G. B. (2015) Status of antioxidant and lipid peroxidation in type 2 diabetic human subjects diagnosed with and without metabolic syndrome by using NCEP-ATPIII, IDF and WHO criteria. *Obesity research & clinical practice* 9(2): 158-67.

- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., and Hotamisligil, G. S. (2010) Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metabolism* 11(6), 467-78.
- Yang, L., Zhao, D., Ren, J., and Yang, J. (2015) Endoplasmic reticulum stress and protein quality control in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et biophysica acta* 1852(2): 209-18.
- Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology* 12(9), 814-22.
- Youle, R. J., and Narendra, D. P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 12(1): 9-14.
- Yu, T., Robotham, J. L., and Yoon, Y. (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8): 2653-8.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., and Shoelson, S. E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293(5535): 1673-7.
- Zachara, N. E., and Hart, G. W. (2006) Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica et biophysica acta* 1761(5-6): 599-617.
- Zafari, A. M., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., Shah, A., Harrison, D. G., Taylor, W. R., and Griendling, K. K. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32(3): 488-95.
- Zamora, M., Pardo, R., and Villena, J. A. (2015) Pharmacological induction of mitochondrial biogenesis as a therapeutic strategy for the treatment of type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology* 98(1): 16-28.
- Zhang, C., Yang, J., Jacobs, J. D., and Jennings, L. K. (2003) Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 285(6): H2563-72.
- Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M., and Jin, S. (2009) Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47): 19860-5.
- Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M. L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., Schmitt, D., Fu, X., Thomson, L., Fox, P. L., Ischiropoulos, H., Smith, J. D., Kinter, M., and Hazen, S. L. (2004) Apolipoprotein A-I is a selective target for

myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *The Journal of clinical investigation* 114(4): 529-41.



## 8. ANEXO





Otras publicaciones con autoría durante el desarrollo de la tesis doctoral:

1. Apostolova N; **Rovira-Llopis S** (co-first); Baldovi HG; Navalon S; Victor VM; Asiri AM; Garcia H; Herance JR. Ceria nanoparticles with Rhodamine B as a powerful theranostic agent against intracellular oxidative stress. RSC Advances. 2015.  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 3,840  
Categoría: CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY (1er cuartil)
2. Victor VM, **Rovira-Llopis S**, Bañuls C, Diaz-Morales N, Castello R, Falcon R, Gomez M, Rocha M, Hernandez Mijares A. Effects of metformin on mitochondrial function of leukocytes from polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. Eur J Endocrinol. 2015 Aug 28. pii: EJE-15-0572. PMID: 26320144  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 4,069  
Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (2º cuartil)
3. Hernández-Mijares A, Bañuls C, **Rovira-Llopis S**, Álvarez A, Orden S, Rubio-Puchol O, Victor VM, Rocha M. Chronic consumption of an inositol-enriched beverage ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in type 2 diabetes. Journal of Functional Foods 2015; 18: 598-607  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 3,574  
Categoría: FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (1er decil)
4. Victor VM, **Rovira-Llopis S**, Bañuls C, Diaz-Morales N, Lopez-Domenech S, Escribano-López I, Rios-Navarro C, Alvarez A, Gomez M, Rocha M, Hernandez-Mijares A. Metformin modulates human leukocyte/endothelial cell interactions and proinflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome patients. Atherosclerosis. 2015 Sep;242(1):167-73. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.017. Epub 2015 Jul 10.  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 3,994  
Categoría: PERIPHERAL VASCULAR DISEASE (1er cuartil)

5. Celia Bañuls, **Susana Rovira-Llopis**, Nuria Monzó, Eva Solá, Blanca Viadel , Víctor M Víctor, Antonio Hernández-Mijares, Milagros Rocha. The consumption of a bread enriched with dietary fibre and L-carnitine improves glucose homeostasis and insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. *Journal of Cereal Science* 2015; 64: 159-167.  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 1,943  
Categoría: FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (2º cuartil)
  
6. Bañuls C, **Rovira-Llopis S**, Falcón R, Veses S, Monzó N, Víctor VM, Rocha M, Hernández-Mijares A. Chronic consumption of an inositol-enriched carob extract improves postprandial glycaemia and insulin sensitivity in healthy subjects: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*. 2015 May 23. pii: S0261-5614(15)00137-5. doi: 10.1016/j.clnu.2015.05.005. [Epub ahead of print]  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 3,940  
Categoría: NUTRITION & DIETETICS (1er cuartil)
  
7. Víctor VM, **Rovira-Llopis S**, Saiz-Alarcón V, Sangüesa MC, Rojo-Bofill L, Bañuls C, de Pablo C, Álvarez Á, Rojo L, Rocha M, Hernández-Mijares A. Involvement of leucocyte/endothelial cell interactions in anorexia nervosa. *European Journal of Clinical Investigation* 2015 Jul;45(7):670-8. doi: 10.1111/eci.12454. Epub 2015 Jun 1.  
Tipo de publicación: Artículo  
Factor de impacto: 2,834  
Categoría: MEDICINE, GENERAL & INTERNAL (1er cuartil)  
MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL (2º cuartil)
  
8. Rocha M; Bañuls C; **Rovira-Llopis S**; Morillas C; Veses S; López-Domenech S; Díaz Morales N; Víctor VM; Hernández-Mijares A. Influence of factors that modulate efficacy of phytosterols. *Phytosterols: Food Sources, Functions and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc., NY (USA), 2015.  
Tipo de publicación: Capítulo de libro
  
9. Víctor VM, **Rovira-Llopis S**, Saiz-Alarcon V, Sangüesa MC, Rojo-Bofill L, Bañuls C, Falcón R, Castelló R, Rojo L, Rocha M, Hernández-Mijares A. Altered

mitochondrial function and oxidative stress in leukocytes of anorexia nervosa patients. PLoS One. 2014 Sep 25;9(9):e106463. doi: 10.1371/journal.pone.0106463. eCollection 2014.

Tipo de publicación: Artículo

Factor de impacto: 3,534

Categoría: MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1er cuartil)

10. Jové M, Naudí A, Portero-Otin M, Cabré R, **Rovira-Llopis S**, Bañuls C, Rocha M, Hernández-Mijares A, Victor VM, Pamplona R. Plasma lipidomics disclose metabolic syndrome with a specific HDL-phenotype. FASEB J. 2014 28(12):5163-71. doi: 10.1096/fj.14-253187. Epub 2014 Aug 28.

Tipo de publicación: Artículo

Factor de impacto: 5,480

Categoría: BIOLOGY (1er decil)

11. Rocha M, Apostolova N, **Rovira-Llopis S**, Bañuls C, Falcón R, Castello R, Hernández-Mijares A, Víctor VM. Mitochondria-targeted antioxidants as a therapeutic strategy for protecting endothelium in cardiovascular diseases. Current Medicinal Chemistry 2014;21(25):2989-3006.

Tipo de publicación: Revisión

Factor de impacto: 3,715

Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY (1er cuartil)

12. Rocha M, **Rovira-Llopis S**, Herance JR, Bañuls C, Polo M, Blas-Garcia A, Hernandez-Mijares A, Victor VM. The Pivotal Role of Nitric Oxide: Effects on the Nervous and Immune Systems. Current Pharmaceutical Design. 2014 Jan 30.

Tipo de publicación: Revisión

PMID: 24251401

Factor de impacto: 3,311.

Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY (1er cuartil)

13. Rocha M, Apostolova N, Herance JR, **Rovira-Llopis S**, Hernandez-Mijares A, Victor VM. Perspectives and Potential Applications of Mitochondria-Targeted Antioxidants in Cardiometabolic Diseases and Type 2 Diabetes. Medicinal Research Reviews. 2014; 34:160-189.

Tipo de publicación: Revisión

PMID: 23650093

Factor de impacto: 10,700.

Categoría: CHEMISTRY, MEDICINAL (1ª de su categoría)

PHARMACOLOGY & PHARMACY (1er decil)

14. **Rovira-Llopis S**, Hernández-Mijares A, Rocha M, Víctor VM. The role of reactive oxygen species in obesity therapeutics. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*. 2014; 9: 629-639.

Tipo de publicación: Revisión

Factor de impacto: no conocido.

15. Rocha Barajas M; **Rovira-Llopis S**; Víctor González VM. Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y enfermedad cardiometabólica. *Guías Clínicas de Metabolismo y Nutrición 3ª Edición revisada*. pp. 413 - 422. Laboratorios Esteve, S.A. España, 2014.

Tipo de publicación: Capítulo de libro

16. Víctor VM; Rocha M; Bañuls C; **Rovira-Llopis S**; Gómez M; Hernández-Mijares A. Mitochondrial impairment and oxidative stress in leukocytes after testosterone administration to female-to-male transsexuals. *The Journal of Sexual Medicine*. 2013; 11:454-461.

Tipo de publicación: Artículo

PMID: 24251401

Factor de impacto: 3,513.

Categoría: UROLOGY & NEPHROLOGY (1er cuartil)

17. Rocha M, Bañuls C, Bellod L, **Rovira-Llopis S**, Morillas C, Solá-Izquierdo E, Víctor VM, Hernández-Mijares A. Association of serum retinol binding protein 4 with atherogenic dyslipidemia in morbid obese patients. *Plos One*. 2013; 8 - 11, pp. e78670.

Tipo de publicación: Artículo

PMID: 24223837

Factor de impacto: 3,730.

Categoría: MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1er cuartil).

- 
18. Rocha M, **Rovira-Llopis S**, Bañuls C, Bellod L, Falcon R, Castello R, Morillas C, Herance JR, Hernandez-Mijares A, Victor VM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in insulin resistance. *Current Pharmaceutical Design*. 2013; 19:5730-5741.  
Tipo de publicación: Revisión  
PMID: 23448492  
Factor de impacto: 3,870.  
Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY (1er cuartil).
19. Rocha M, Herance R, **Rovira S**, Hernández-Mijares A, Victor VM. Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infectious Disorders Drug Targets (Formerly Current Drug Targets)*, 2012; 12: 161-78.  
Tipo de publicación: Revisión  
PMID: 22420514.  
Factor de impacto: 3,553.  
Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY (1er cuartil)