



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

Estudio del papel de los haplogrupos mitocondriales, el control glucémico y el tratamiento con metformina sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la diabetes tipo 2

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Fisiología

Presentada por:

Noelia Díaz Morales

Dirigida por:

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Dra. Susana Rovira Llopis

Dra. Milagros Rocha Barajas

Valencia, Noviembre 2018

Programa de Doctorado 3127. Doctorado en Fisiología (RD 99/2011).

Facultad de Medicina y Odontología. Departamento de Fisiología.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctoranda

Noelia Díaz Morales

Licenciada en Biotecnología

Universidad de León

Directores

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Investigador de FISABIO y Profesor Asociado de la Universidad de Valencia

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dra. Susana Rovira Llopis

Investigadora Juan de la Cierva de FISABIO

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dra. Milagros Rocha Barajas

Investigadora Miguel Servet de FISABIO

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Con la colaboración de:

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Instituto de Salud Carlos III. Acción Estratégica en Salud.

Publicado en **Valencia, 2018.**



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

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

Dra. Susana Rovira Llopis, Investigadora Juan de la Cierva en la Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia,

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

CERTIFICAN:

Que **Dña. Noelia Díaz Morales**, Licenciada en Biotecnología por la Universidad de León, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Estudio del papel de los haplogrupos mitocondriales, el control glucémico y el tratamiento con metformina sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la diabetes tipo 2”** y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Fisiología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 23 de Noviembre de 2018.

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Dra. Susana Rovira Llopis

Dra. Milagros Rocha Barajas

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la financiación de los proyectos:

“Estudio de la dinámica mitocondrial, el inflammasoma y su relación con las complicaciones cardiovasculares en la diabetes tipo 2: Implicaciones fisiopatológicas y clínicas”, con referencia PI16/01083; “Papel de la autofagia y el inflammasoma en la fisiopatología de la obesidad: Efecto de la pérdida de peso y posibles implicaciones terapéuticas”, con referencia PI16/00301; y “Disfunción endotelial-mitocondrial, estrés de retículo y autofagia en la diabetes tipo 2: Implicaciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas” con referencia PI13/01025; del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), de la Convocatoria de Ayudas de la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III. Ayudas cofinanciadas con fondos FEDER “Una manera de hacer Europa”.

Noelia Díaz Morales ha disfrutado de una Ayuda Predoctoral del Fondo de Investigación Sanitaria (PFIS), con referencia FI14/00125; una Ayuda de Movilidad para personal investigador contratado en el marco de la Acción Estratégica en Salud, con referencia MV17/00037, ambas del Instituto de Salud Carlos III; y una Beca de Movilidad internacional para estudiantes de doctorado de la Universidad de Valencia.

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

“Siempre acabamos llegando a donde nos esperan”

José Saramago

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis surgió como ese ventanal que se abre cuando decides cerrar una puerta, y se convirtió en la mejor oportunidad para emprender mi nuevo camino y cumplir un sueño que estaba muy cerca de desvanecerse.

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis Directores, por haberme permitido crecer como investigadora en su laboratorio. Víctor, aún recuerdo cuando descubrimos que nos unía algo más que el amor por la ciencia, y es que nos fuimos a juntar dos descendientes de Aldeanueva de Figueroa en un laboratorio de Valencia; ¡qué pequeño es el mundo! Muchas gracias por enseñarme que con esfuerzo todo es posible (aunque eso suponga leer por las noches), pero sobre todo por confiar en mí y en mi trabajo. A Milagros, por su gran comprensión a nivel humano, por sus lecciones de estadística, por aportar ese rayo de luz cuando todo se vuelve negro, gracias por tus consejos y tu visión crítica que hacen replantearte lo que ya dabas por sentado. A Susana, gran maestra, gracias por tu frescura, por tu energía positiva que se contagia sólo con oírte de fondo, por enseñarme que las cosas no son siempre blancas o negras, sino que hay muchas tonalidades de grises que pueden verse sólo si se miran desde otra perspectiva.

Quiero dar las gracias a todos y cada uno de los miembros del Servicio de Endocrinología del Hospital Dr. Peset. En especial, al Dr. Hernández, por su apoyo, sus palabras de ánimo y por todos los consejos tanto a nivel profesional como personal.

A mis chicas del Lab, más que compañeras, amigas. A Sandra, comenzamos juntas esta aventura y de la mano llegamos al final, muchas gracias por tu cariño y por hacerme ver que existe vida fuera de estas cuatro paredes. A Celia, por tu sinceridad y por tener siempre las palabras adecuadas para cada situación. A Rosa, el abrazo reconfortante de quien se ha ganado a pulso el título de “mi madre valenciana”. A Irene, desde el principio demostraste que serías un buen fichaje, gracias por tu optimismo y tu risa omnipresente. A Francesca, mi italiana favorita, muchas gracias por todos los momentos divertidos que nos brindas a diario. A Arantxa, tu perseverancia en la búsqueda de tu sueño me ha hecho ver que la vida es de los que luchan, gracias por tu valentía. A Zaida, porque tus ganas de aprender y tu gran esfuerzo hacen que sea un placer trabajar a tu lado, muchas gracias por tu ingenio. A Estefanía, porque has llegado cargada de buen rollo, energía positiva y palabras de ánimo. A Carmen, porque derrochas simpatía por todos los poros de tu piel, no sabes lo que te echamos de menos. A todas vosotras, mil gracias por haberme enseñado mucho más que a hacer experimentos. Agradecer también a los compañeros de Oftalmología (Óscar, Silvia, Vicente y M^a Dolores), y a los del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, por vuestra ayuda y buen humor.

A mi familia, pilar fundamental en mi vida. A mis padres y mi hermano, esta tesis es tan vuestra como mía, gracias por abrirme los ojos, por ayudarme a dar el portazo que necesitaba para cerrar un capítulo, y por apoyarme en todo lo bueno que vino después. Pero, sobre todo, gracias por cuidarme, por quererme y por inculcarme los valores que hacen que hoy sea la persona que soy. A mi madre, por todos tus sacrificios, por no dudar ni un segundo en acudir a cuidarme cuando la salud flaquea. A mi padre, por enseñarme el valor de las cosas bien hechas. A mi hermano, por demostrarme que hay que pelear por lo que uno quiere y siempre aspirar a más. A mi abuela, siempre preocupada de que esté bien. A todos mis tíos, primos, y nuevas incorporaciones a la familia, porque son los ratos que pasamos juntos los que hacen que la vida valga la pena. En especial quisiera agradecer a mi tía Gabi por haber sido mi segunda madre, sé muy bien cuánto te gustaría “verme por un agujerito cuando estoy haciendo experimentos”. A los que ya no estáis, espero que estéis orgullosos de “la niña”.

A Félix, mi compañero de vida, gracias por todo lo que me demuestras día a día, por lo que has aguantado durante los últimos meses, por tu ayuda incondicional, por hacerme reír, por cuidarme, por mimarme, por mostrarme el lado positivo de las cosas, y por mantener siempre esa “sonrisa en el corazón” que tanto mencionas, aunque estén cayendo chuzos de punta.

A mis amigos de siempre, mis “Montijeros”, mis scouts favoritos: Álex, Andrea, Bea, Sara, Patri, Silvia. Mirad a “la Noe”, al final se hace doctora sin haber descubierto ninguna vacuna... Gracias por crecer a mi lado, por ser las mejores personas de las que una se puede rodear y por hacer que cada rato junto a vosotros sea inolvidable y suponga agujetas al día siguiente por las risas. Gracias a Leti, por esos cafés para ponernos al día. A la gente de mi pueblo. A Isa, mi valenciana preferida, gracias por contagiarme felicidad y armonía, por escucharme, por ayudarme.

Gracias a Eduardo, Julio, Ester y todo vuestro Grupo de Investigación en la Universidad de Zaragoza, por acogerme en vuestro laboratorio como a una más y enseñarme tanto en tan poco tiempo. Thanks to all the members of DPAG (University of Oxford) for three wonderful months enjoying your lab. Especially, thanks to Lisa and Luz for all the things that you taught me.

A mis orígenes en la Universidad de León, muchas gracias al Grupo de Neurobiología, liderado por Arsenio Fernández, donde comenzó a picarme el gusanillo de la investigación. Al equipo del LTI, por 8 maravillosos meses. A mis “Biotecs Molonguis”: Alba, Pablo, Rocío, Álvaro, Ramírez, Castosa, Pascua, Ana, Suso, Andrés, Claudia, Diego, Alicia, os convertisteis en mi familia durante 5 años geniales. Alba, ¡esta tesis va por ti! A Marta y Ruth, mis técnicas favoritas. A Maria Jesús, por un año inolvidable.

A los que se me olvidan, o no puedo mencionar por cuestiones de espacio, MUCHAS GRACIAS.

A mis padres y mi hermano

A Félix

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABSTRACT	1
RESUMEN GLOBAL.....	9
1. TEMÁTICA.....	11
1.1. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	13
1.1.1. Definición.....	13
1.1.2. Epidemiología e impacto socio-económico	13
1.1.3. Fisiopatología	13
1.1.3.1. Homeostasis de la glucosa.....	13
1.1.3.2. Ruta de señalización de la insulina	14
1.1.3.3. Resistencia a la insulina	16
1.1.3.4. Disfunción de las células β pancreáticas	17
1.2. Manifestaciones clínicas de los pacientes con DM2.....	18
1.2.1. Sobrepeso y obesidad	18
1.2.2. Alteración del control glucémico	19
1.2.2.1. Tratamientos antidiabéticos.....	20
1.2.2.1.1. Metformina: Mecanismo de acción	20
1.2.3. Dislipidemia aterogénica.....	22
1.2.4. Hipertensión arterial	23
1.3. Mecanismos asociados al riesgo cardiovascular.....	25
1.3.1. Respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado.....	25
1.3.2. Disfunción endotelial	27
1.3.3. El proceso aterosclerótico.....	28
1.3.4. Interacción leucocito-endotelio.....	30
1.4. Consecuencias de la DM2: Complicaciones vasculares asociadas	32
1.4.1. Complicaciones microvasculares de la DM2.....	32
1.4.2. Complicaciones macrovasculares de la DM2	33
1.5. Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la DM2	35
1.5.1. Estrés oxidativo	35
1.5.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	35
1.5.1.2. La mitocondria como fuente de ERO.....	35
1.5.1.2.1. El proceso de la fosforilación oxidativa	35
1.5.1.2.2. Generación de ERO mitocondriales	36
1.5.1.3. Generación de ERO no mitocondriales.....	36

1.5.1.4. Defensas antioxidantes	37
1.5.1.5. Estrés oxidativo en la DM2.....	39
1.5.1.5.1. Hiperglucemia y estrés oxidativo.....	40
1.5.1.5.1.1. Ruta del polialcohol	40
1.5.1.5.1.2. Ruta de la hexosamina	41
1.5.1.5.1.3. Activación de la ruta de la PKC	41
1.5.1.5.1.4. Formación de productos avanzados de glucosilación (AGEs).....	41
1.5.1.5.2. Defensas antioxidantes en la DM2	42
1.5.2. Disfunción mitocondrial	43
1.5.2.1. Variaciones en el ADNmt y DM2.....	44
1.5.2.1.1. Haplogrupos mitocondriales.....	45
1.5.3. Dinámica mitocondrial	46
1.5.3.1. Dinámica mitocondrial en la DM2	48
1.5.4. Activación de la respuesta a proteínas mal plegadas	49
1.5.4.1. Estrés de RE en la DM2	52
1.5.5. Autofagia.....	54
1.5.5.1. Autofagia en la DM2.....	56
1.6. Hipótesis y objetivos	59
2. PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3. CONCLUSIONES	83
CONCLUSIONS.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	91
ANEXO I. PUBLICACIONES	125
Mitochondrial DNA Haplogroup JT is Related to Impaired Glycaemic Control and Renal Function in Type 2 Diabetic Patients	127
Are Mitochondrial Fusion and Fission Impaired in Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients?.....	139
Does Metformin Protect Diabetic Patients from Oxidative Stress and Leukocyte- Endothelium Interactions?	147
Does Metformin Modulate Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Type 2 Diabetic Peripheral Blood Mononuclear Cells?	155
ANEXO II.....	163
Otras publicaciones con autoría durante el desarrollo de la tesis doctoral	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Homeostasis de la glucosa	14
Figura 2. Mecanismos asociados a la resistencia a la insulina.	16
Figura 3. Efectos beneficiosos de la metformina y mecanismos de acción	22
Figura 4. Patogénesis del proceso aterosclerótico	29
Figura 5. Producción y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	38
Figura 6. Regulación de la dinámica mitocondrial	47
Figura 7. Las tres vías respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	51
Figura 8. Autofagia.....	55

ABREVIATURAS

ADNmt: ADN mitocondrial

AGEs: Productos avanzados de glucosilación

AGL: Ácidos grasos libres

Akt: Proteína quinasa B, también denominada PKB

AMP: Adenosina monofosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

AP-1: Proteína activadora 1

ApoB: Apolipoproteína B

ARE: Elementos de respuesta antioxidante

ARNt: ARN de transferencia

ATF4: Factor de transcripción activador 4

ATF6: Factor de transcripción activador 6

ATG: Proteínas relacionadas con la autofagia

ATP: Adenosina trifosfato

BECN1: Beclina 1

CAM: Moléculas de adhesión celular

CAT: Catalasa

c-HDL: Colesterol HDL

CHOP: Proteína homóloga de C/EBP

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DRP1: Proteína relacionada con la dinamina 1

eIF2 α : Factor iniciador de la traducción eucariota 2 α

eNOS: NO sintetasa endotelial

ERAD: Sistema de degradación de proteínas asociado al RE

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FG: Filtrado glomerular

FIS1: Proteína de fisión 1

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GFAT: Glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa

GLP1: Péptido similar al glucagón de tipo 1

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4

GPX: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GRP78: Proteína de 78KDa regulada por glucosa

GSH: Glutati3n reducido

GSSG: Glutati3n oxidado

GST: Glutati3n S-transferasa

GTP: Guanosina trifosfato

H₂O: Agua

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno

HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada A_{1c}

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HOMA-IR: Índice de evaluaci3n de resistencia a la insulina con el modelo homeostático

HUVEC: Células endoteliales humanas de cord3n umbilical

ICAM: Moléculas de adhesi3n intercelular

IKK β : Inhibidor de la subunidad β de la quinasa de NF- κ B

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

IMC: Índice de masa corporal

IR: Receptor de la insulina

IRE1: Proteína 1 que requiere inositol

IRS: Sustratos del receptor de insulina

JNK: c-Jun NH₂-terminal

KEAP1: Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch

LC3: Proteína de cadena ligera 3 asociada a microt3bulos

LC3-I: Forma citos3lica de LC3

LC3-II: Forma conjugada de LC3

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

MFF: Factor de fisi3n mitocondrial

MFN: Mitofusina

MiD49: Proteína de dinámica mitocondrial de 49 KDa

MiD51: Proteína de dinámica mitocondrial de 51 KDa

mTOR: Proteína diana de la rapamicina en mamíferos

mTORC1: Complejo 1 de la proteína diana de la rapamicina en mamíferos

NADPH: Nicotinamida adenina dinuce3tido fosfato

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NO: Óxido nítrico

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: Factor nuclear eritroide 2

$\cdot\text{OH}$: Radical hidroxilo

O_2 : Oxígeno molecular

$\text{O}_2^{\cdot-}$: Anión superóxido

OPA1: Proteína de la atrofia óptica 1

p70S6K: Quinasa de la proteína ribosomal S6

PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1

PCR: Proteína C reactiva

PECAM: Molécula de adhesión plaqueto-endotelial

PERK: Quinasa del RE tipo PKR

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PKC: Proteína quinasa C

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

RAGE: Receptores de productos avanzados de glucosilación

RE: Retículo endoplasmático

sCAM: Moléculas de adhesión celular solubles

SIRT3: Sirtuina 3

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido

SOD: Superóxido dismutasa

sXBP1: "Spliced XBP1"

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TRAF2: Factor 2 asociado al receptor de TNF- α

TXNIP: Proteína que interactúa con la tiorredoxina

UKPDS: Estudio Prospectivo de Diabetes de Reino Unido (UK Prospective Diabetes Study)

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

VCAM: Moléculas de adhesión vascular

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

XBP1: Proteína 1 de unión a X-box

ABSTRACT

Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disease characterized by impaired insulin signalling (known as insulin resistance) that, together with a progressive loss of pancreatic β -cell function, leads to abnormal metabolism of carbohydrates and lipids. As a consequence, T2D patients usually present hyperglycaemia, dyslipidaemia, hypertension, chronic low-grade inflammation, and atherosclerosis. Although there is an important genetic component in the predisposition to the disease, the increasing prevalence of T2D appears to be closely related to obesity, sedentary lifestyle, high-calorie diet and ageing. For all these reasons, T2D has become a major health problem worldwide, and patients with T2D run a high risk of developing microvascular complications (nephropathy, retinopathy and neuropathy) and macrovascular complications (cardiovascular disease such as coronary artery disease, peripheral arterial disease, and stroke), which substantially limit their quality of life and can lead to irreversible damage, and even death.

Hyperglycaemia is a main driver in the development of T2D-associated vascular complications. Thus, an adequate glycaemic control is essential for preventing and delaying the onset of these complications. For this purpose, many anti-hyperglycaemic drugs are used to treat T2D patients, metformin being the most commonly prescribed. Metformin treatment has been shown not only to decrease blood glucose levels and to improve peripheral insulin sensitivity, but also to exert beneficial effects on the heart and vasculature. Nevertheless, the mechanisms by which metformin exerts these beneficial effects are not fully understood.

Mitochondria play a crucial role in metabolism, and hence in the progress of metabolic disorders such as T2D. These organelles are responsible for ATP production through oxidative phosphorylation, a process that leads to reactive oxygen species (ROS) production, especially when mitochondrial function is impaired. Variations in mitochondrial DNA (mtDNA) can affect mitochondrial function and might enhance the risk of developing T2D. In this sense, it has been suggested that mitochondrial haplogroups are involved in T2D and their associated complications, although this is a subject of controversy. Therefore, further research is needed to clarify the potential relationship between mitochondrial haplogroups and metabolic diseases such as T2D.

Oxidative stress is one of the main characteristics of T2D patients, and is a result of excessive ROS production (mainly due to hyperglycaemia) and a weak antioxidant defence system. On the other hand, activation of the immune system and the release of pro-inflammatory cytokines are responsible for the chronic inflammation observed in T2D. Both oxidative stress and

inflammation can cause damage to the vasculature and are considered key pathophysiological mechanisms involved in the onset and progression of T2D and its associated complications. Under these conditions, damaged endothelial cells induce the expression of cytokines and adhesion molecules that favour the recruitment of activated leukocytes towards the vascular wall. Leukocytes contribute to oxidative stress and the subsequent inflammation, thus aggravating the accompanying endothelial dysfunction and initiating the atherosclerotic process. Therefore, leukocytes are key candidates in the study of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of T2D, which include not only oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation, but also endoplasmic reticulum (ER) stress and autophagy.

A correct balance between fusion and fission events determines the maintenance of a healthy mitochondrial network in the cell, and alterations in the machinery controlling mitochondrial dynamics can cause mitochondrial dysfunction. In this context, it has been described that altered mitochondrial dynamics contribute to endothelial dysfunction under diabetic conditions; however, whether and how this affects the leukocytes from T2D patients, and if it is relevant to their interactions with the endothelium, has not yet been addressed.

As sensors of stress, ER homeostasis and autophagy are essential for preserving cell function and viability. Pathological conditions, such as oxidative stress, lead to accumulation of unfolded or misfolded proteins, which disturb ER homeostasis and activate the unfolded protein response (UPR) in order to restore the correct function of the ER. In addition, autophagy is closely linked to oxidative and ER stress, as it mediates the degradation of protein aggregates, damaged ER components, and dysfunctional mitochondria. All these mechanisms may contribute to the increased leukocyte-endothelial interactions in T2D patients. Thus, in the light of the beneficial effects of metformin treatment on the vasculature of T2D patients, we have set out to determine whether it can affect leukocyte-endothelium interactions by modulating molecular processes related to oxidative stress (such as expression of antioxidant enzymes, ER stress, and autophagy) in leukocytes of T2D patients treated or not with metformin.

Objectives

In the present doctoral thesis, we have aimed to determine the impact of the mtDNA haplogroups that are most prevalent in the Spanish population on metabolic characteristics and renal function in T2D patients and healthy controls.

We also aimed to evaluate mitochondrial function, ROS production, and expression of proteins involved in mitochondrial dynamics in leukocytes isolated from healthy volunteers and T2D patients with different levels of glycaemic control, as well as the relationships between these parameters and leukocyte-endothelium interactions.

Our third objective was to study potential differences in ROS production, expression of antioxidant defence-related enzymes, and interactions with the endothelium of leukocytes isolated from T2D patients, some of which were treated with metformin and others of which were not, and healthy controls, in addition to their serum levels of soluble adhesion molecules.

Finally, we aimed to assess markers of the different UPR pathways and the autophagic process, in addition to their relationship with oxidative stress in leukocytes from diabetic patients undergoing treatment with (or without) metformin and in the respective control volunteers.

Methods

T2D patients and healthy volunteers underwent a physical examination to determine their weight, height, blood pressure, waist and hip circumference, and blood samples were obtained from the antecubital vein in fasting conditions. Parameters of glycaemic control, lipid profile, inflammation and renal function were assessed in serum by routine methods. Adhesion molecules were measured in serum using XMAP technology and a Luminex® 200 flow analyzer device (Luminex Corporation). Total DNA was extracted from whole blood and mtDNA haplogroups HV, U and JT were determined by means of custom-designed Taqman® SNP genotyping assays in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). The following polymorphisms were assessed: m.7028C>T or m.14766T>C for HV; m.12308A>G for U; and m.4216T>C for JT. Leukocytes were isolated from blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient separation and were used for the subsequent experiments. O₂ consumption in leukocytes was measured with a Clark-type O₂ electrode (Hansatech). ROS production and intracellular GSH levels were assessed by fluorometry using a fluorescence microscope (IX81; Olympus) coupled to the static cytometry software “ScanR” (Olympus), after incubating leukocytes with the following fluorescent probes: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (measurement of total ROS), MitoSOX™ (marker of mitochondrial O₂⁻), and 5-chloromethylfluorescein diacetate (indicator of GSH content). Leukocyte-endothelium interaction assays were carried out using a parallel flow chamber in which a leukocyte suspension was drawn across a monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) at physiological flow rate. Real-time microscope videos (5 min) were recorded and later analyzed

to calculate leukocyte rolling velocity, flux and adhesion. Finally, total RNA and protein extractions from leukocytes were performed and levels of antioxidant defences, mitochondrial dynamics, ER stress, and autophagy markers were evaluated by RT-qPCR and Western blotting assays. The statistics software programmes SPSS 17.0 and Graphpad Prism 5.0 were employed for data analysis.

Results and discussion

T2D patients showed impaired glucose homeostasis, with higher levels of fasting glucose, HbA_{1C}, insulin, and HOMA-IR than control volunteers. Most T2D patients were treated with antidiabetic drugs, with metformin being the most commonly prescribed (administered to around 70% of the study's patients). Our diabetic population was characterized by being overweight or obese, and with enhanced BMI and waist-to-hip ratio in comparison to the control group. Moreover, the increases in C-reactive protein levels observed in T2D patients with respect to controls suggested low-grade systemic inflammation, probably due to excess weight, since differences disappeared after BMI-adjustment. T2D patients had higher blood pressure than controls, and nearly half were undergoing antihypertensive therapy. Altered lipid profile was also observed in T2D patients, with enhanced levels of triglycerides and reduced amounts of HDL cholesterol when compared to the control population, which are typical characteristics of atherogenic dyslipidaemia. The lower levels of total and LDL cholesterol with respect to controls were probably attributable to the antihyperlipidemic treatment followed by most of our diabetic patients.

After exploring the distribution of mtDNA haplogroups in our T2D and control populations we did not find a direct association between the main macro-haplogroups and the presence of T2D. Nevertheless, diabetic patients with the JT haplogroup exhibited higher levels of fasting plasma glucose, HbA_{1C}, and creatinine, and lower estimated glomerular filtration rates (eGFR) than patients belonging to the HV, U and other haplogroups. These results imply that the mtDNA JT haplogroup (in particular the variant m.4216T>C) is associated with a worse management of glucose in T2D patients, which can contribute to a deterioration of renal function, thus predisposing the individual to the development of diabetic nephropathy.

Mitochondrial function and dynamics were studied in leukocytes isolated from healthy controls and T2D patients with different glycaemic control status, and leukocyte interactions with the endothelium were also evaluated. T2D leukocytes displayed increased production of

mitochondrial and total ROS, and decreased mitochondrial O₂ consumption, the latter correlating negatively with levels of HbA_{1c}. Expression of mitochondrial fusion proteins (MFN1, MFN2 and OPA1) was lower in leukocytes of T2D patients when compared with healthy controls, whereas fission proteins (FIS1 and DRP1) were enhanced, although statistical significance was not reached for DRP1. Moreover, HbA_{1c} levels were correlated negatively with mitochondrial fusion (MFN2 and OPA1) and positively with fission (FIS1). Leukocytes from T2D patients interacted more frequently with the endothelium, especially in cases of poor glycaemic control. Interestingly, increases in leukocyte-endothelium interactions were associated with the altered leukocyte expression levels of mitochondrial fusion and fission proteins. Our data suggest that loss of glycaemic control in T2D patients is related with an imbalance of mitochondrial dynamics in their leukocytes, which compromises mitochondrial function and may lead to oxidative stress and enhanced interactions with endothelial cells.

The effects of metformin treatment on oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions were assessed in leukocytes isolated from T2D patients that were or were not taking this medication. Our results showed a significant reduction in mitochondrial ROS production, increases in mRNA expression levels of *GPX1* and *SIRT3*, and decreased interactions with endothelial cells (enhanced rolling velocity; and reduced rolling flux and adhesion) in leukocytes from metformin-treated patients versus those from patients not treated with the drug. In addition, the increased circulating levels of ICAM-1 and P-selectin adhesion molecules observed in patients not receiving metformin were reverted to control values in T2D patients treated with metformin. These results support a beneficial impact of metformin treatment on oxidative stress, endothelial function and leukocyte-endothelium interactions. This may be implicated in the protective role of metformin in the diabetic vasculature, which could prevent associated vascular complications.

Finally, we studied the potential effect of metformin treatment on the modulation of UPR pathways and autophagy in leukocytes from T2D patients. We observed that leukocytes of both groups of T2D patients (treated or not with metformin) had enhanced protein levels of GRP78 with respect to controls, thus indicating an increase in ER stress. Besides, assessment of mitochondrial O₂^{•-} production, intracellular content of GSH and representative markers of the three UPR pathways and the autophagy process displayed a different pattern in leukocytes from T2D patients depending on whether or not the patient was being treated with metformin. Thus, a reduction in oxidative stress (decreased levels of mitochondrial O₂^{•-}, and enhanced GSH content), together with an increase in the UPR pathways initiated by IRE1 and PERK (assessed by protein levels of p-eIF2 α and mRNA levels of *s-XBP1*) may block the autophagic response in

the leukocytes of metformin-treated patients. In contrast, in leukocytes from patients not treated with metformin, the increased oxidative stress (higher mitochondrial ROS production and reduced GSH content) and the ATF6-dependent branch of UPR (manifested by elevated protein levels of ATF6) might increase autophagy (mRNA levels of *BECN1*, *ATG7* and protein LC3 II/I ratio) in order to clear misfolded proteins.

Overall, the findings of the current doctoral thesis support the involvement of the mtDNA haplogroup JT, oxidative stress, mitochondrial dynamics, endothelial dysfunction, ER stress and autophagy in the pathophysiology of T2D and suggest a role of these processes in the development of vascular complications. Moreover, they support the hypothesis that treatment of T2D patients with metformin modulates different cellular stress pathways (such as oxidative stress, UPR, and autophagy) in leukocytes in order to reduce their interaction with the endothelium, which may delay the onset of the atherosclerotic process and, consequently, the development of T2D-associated vascular complications.

RESUMEN GLOBAL

1. TEMÁTICA

1.1. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

1.1.1. Definición

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico caracterizado por una respuesta inadecuada a la acción de la insulina, conocida como resistencia a la insulina, que da lugar a un metabolismo de carbohidratos y lípidos alterado. Como consecuencia, los pacientes con DM2 presentan con frecuencia hiperglucemia, dislipidemia y obesidad, y desarrollan una situación de inflamación crónica de bajo grado y un proceso de aterosclerosis prematuro.

1.1.2. Epidemiología e impacto socio-económico

La DM2 se ha convertido en uno de los problemas de salud a nivel mundial más graves de nuestro tiempo. Según la Federación Internacional de Diabetes, en el año 2017 había en todo el mundo 425 millones de personas de entre 20 y 79 años con diabetes, y se estima que esta cifra aumentará hasta los 629 millones en el año 2045 (un aumento del 48%) (Cho *et al.*, 2018). El 90% de los casos corresponden a pacientes con DM2, siendo ésta la forma más frecuente de diabetes (Bruno *et al.*, 2005; Holman *et al.*, 2015). El estilo de vida sedentario, el aumento de la obesidad, las dietas ricas en energía y el envejecimiento de la población son los principales factores que están contribuyendo al aumento del número de personas con DM2 (Chatterjee *et al.*, 2017), especialmente en países en vías de desarrollo.

La diabetes, a causa de su naturaleza crónica, supone un desafío no sólo a nivel sanitario sino también a nivel social y económico. En 2015 fue considerada como la sexta causa de discapacidad en el mundo (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016), dando lugar a una elevada carga económica que alcanzó en 2017 un gasto global anual de 850.000 millones de dólares americanos en atención sanitaria (Cho *et al.*, 2018).

La DM2 constituye un reto para la salud en todo el planeta, por lo que el estudio en profundidad de esta enfermedad y sus causas es fundamental para la promoción del desarrollo de estrategias enfocadas a su prevención y la mejora de la atención sanitaria, con el fin de disminuir el impacto de la DM2 en la sociedad.

1.1.3. Fisiopatología

1.1.3.1. Homeostasis de la glucosa

La glucosa presente en el plasma proviene no solo de la dieta, sino también de la glucogenolisis y la gluconeogénesis. En el cuerpo humano, existe una red de hormonas y neuropéptidos perfectamente coordinados que controla los niveles de glucosa en sangre y permite

mantenerlos en un estrecho rango fisiológico (4-6mM). Este proceso tan controlado y esencial para los mamíferos es conocido como homeostasis de la glucosa (Figura 1) y en él participan órganos como el páncreas, hígado, cerebro e intestino, y tejidos como el muscular y el adiposo. Tras la ingesta de alimentos, se produce un aumento de los niveles de glucosa en sangre que promueve la secreción de insulina por las células β pancreáticas. La insulina se une a su receptor en el músculo y tejido adiposo permitiendo la captación y utilización de glucosa por estos tejidos. Además, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa y promueve la glucogenogénesis, la lipogénesis y la incorporación de aminoácidos en las proteínas; en resumen, es una hormona con un perfil claramente anabólico. Por otro lado, en condiciones de ayuno, cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, las células α pancreáticas liberan glucagón, una hormona con actividad catabólica que promueve la glucogenolisis hepática y la gluconeogénesis en hígado y riñón, estimulando la liberación de glucosa a la sangre (Roder *et al.*, 2016).

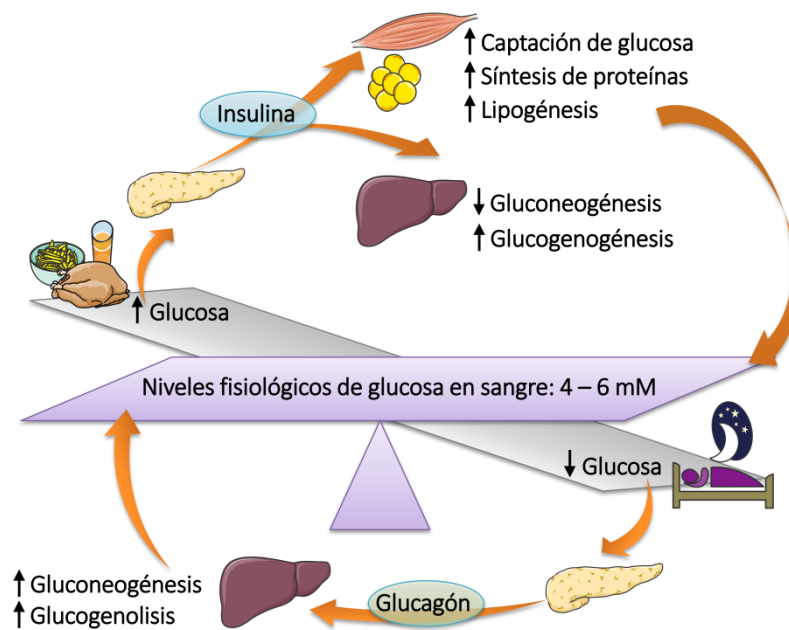


Figura 1. Homeostasis de la glucosa. Tras la ingesta de alimentos, cuando aumenta la glucemia, el páncreas libera insulina que promueve la utilización de glucosa por parte de los tejidos periféricos. Al mismo tiempo, la insulina inhibe la gluconeogénesis hepática y estimula la síntesis de glucógeno. Cuando los niveles plasmáticos de glucosa descienden, el páncreas secreta glucagón para estimular la síntesis de glucosa y mantener sus niveles circulantes dentro del rango fisiológico.

1.1.3.2. Ruta de señalización de la insulina

El receptor de la insulina (IR) es una proteína transmembrana heterotetramérica que pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa. Cuando la insulina se une a su receptor, la

actividad tirosina quinasa se activa y provoca una autofosforilación que permite el reclutamiento de otras proteínas que inician distintas rutas de señalización. Entre las primeras proteínas que son reclutadas se encuentran los sustratos del receptor de insulina (IRS). Se ha descrito que existen 4 miembros de la familia de los IRS implicados en la señalización por insulina, siendo IRS-1/2 los más importantes en el transporte de glucosa (Saltiel y Kahn, 2001). Los IRS se unen al IR, se fosforilan y sirven a su vez como anclaje para otras proteínas que continúan con la ruta de la insulina de manera específica dependiendo del tejido y tipo celular. Por ejemplo, la ruta de la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (PKB, también conocida como Akt) es responsable de los efectos metabólicos de la insulina: captación de glucosa, síntesis de glucógeno e inhibición de la lipólisis en músculo, hígado y tejido adiposo, respectivamente (Boucher *et al.*, 2014). IRS-1 fosforilado activa la subunidad catalítica de la PI3K, que convierte el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). La acumulación de este segundo mensajero permite el anclaje de la quinasa Akt a la membrana plasmática, donde se activa por fosforilación. Akt se considera el elemento central en las acciones de la insulina (Cho *et al.*, 2001), al participar en la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) desde vesículas intracelulares a la superficie celular. Además, Akt también está implicada en la síntesis de glucógeno a través de su acción sobre la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3) (Summers *et al.*, 1999), en la síntesis de proteínas mediante la activación de la ruta mTORC1/p70S6K (Proud *et al.*, 2001), y en la acción anti-lipolítica de la insulina tras la fosforilación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) y el descenso en los niveles de AMP cíclico (Kitamura *et al.*, 1999).

La ruta de señalización de la insulina posee mecanismos de retroalimentación negativa que permiten frenarla y evitar que se produzca una respuesta desmesurada. Entre estos mecanismos se encuentran algunas fosfatasas capaces de desfosforilar y reducir la actividad de diferentes intermediarios de la ruta. Tal es el caso de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), que desfosforila residuos tirosina del IR o de las proteínas IRS y, por tanto, reduce su actividad (Goldstein *et al.*, 1998). Además, existe también una regulación por fosforilación en residuos serina o treonina de las proteínas IRS, que impide su activación por el IR y promueve su degradación por el proteasoma, disminuyendo la transducción de señales de la ruta de la insulina (Greene *et al.*, 2003). Estos mecanismos de retroalimentación negativa pueden activarse en respuesta a señales generadas por estrés celular, citoquinas proinflamatorias o altos niveles de ácidos grasos libres (AGL), que inhiben la cascada de señalización de la insulina y que, de forma crónica, promueven el desarrollo de resistencia a la insulina.

1.1.3.3. Resistencia a la insulina

En condiciones normales, la homeostasis de la glucosa se mantiene gracias al buen funcionamiento de las interacciones entre los diferentes órganos y tejidos. Sin embargo, en determinadas ocasiones, se produce una alteración en dichas interacciones que da lugar al desarrollo de enfermedades metabólicas como la DM2. La DM2 es considerada una patología dual en la que se ve afectada tanto la acción de la insulina sobre los tejidos diana (resistencia a la insulina) como la secreción de la misma por las células β pancreáticas (disfunción de las células β) (DeFronzo *et al.*, 2015). La resistencia a la insulina (Figura2) ocurre cuando las células pierden la capacidad para responder correctamente a la acción hipoglucemiante de la insulina, lo que conlleva una reducción de la captación de glucosa por parte de tejidos periféricos (Carnagarin *et al.*, 2015) y un aumento de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática (Roden y Bernroider, 2003), con el consiguiente incremento de los niveles de glucosa en sangre. A causa de la resistencia a la insulina, en el tejido adiposo se activa la lipólisis aumentando los niveles circulantes de AGL (DeFronzo, 2004). El exceso de AGL se acumula en el músculo esquelético y el hígado (acumulación ectópica de lípidos) acrecentando aún más la resistencia a la insulina y favoreciendo la hiperlipidemia a través de la síntesis hepática de triglicéridos (Samuel y Shulman, 2016).

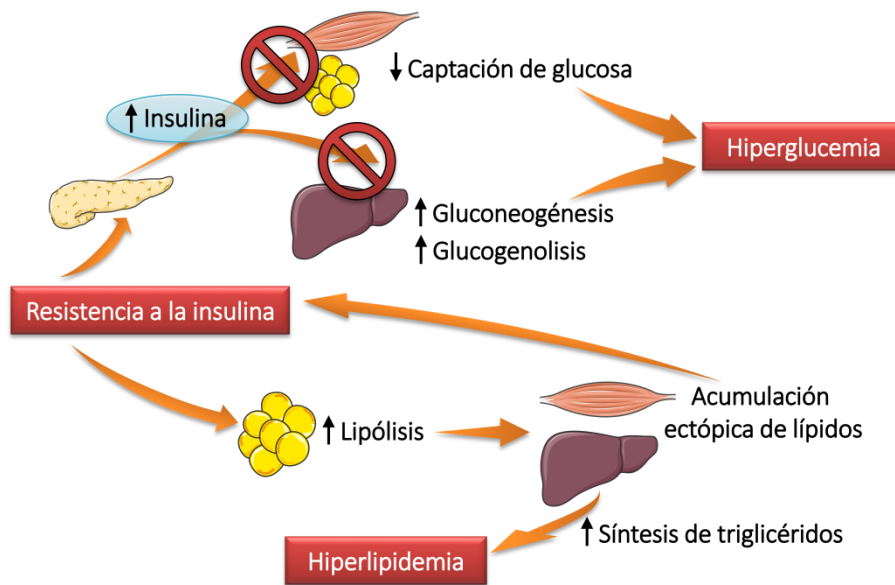


Figura 2. Mecanismos asociados a la resistencia a la insulina. Cuando la señalización de la insulina se ve alterada, el páncreas incrementa su producción como un mecanismo compensatorio. Sin embargo, la resistencia a la insulina en hígado y tejidos periféricos provoca un aumento de los niveles circulantes de glucosa y, en consecuencia, se produce hiperglucemia. Por otra parte, la falta de acción de la insulina en el tejido adiposo estimula la liberación de ácidos grasos agravando la resistencia a la insulina y promoviendo la hiperlipidemia.

Desde el punto de vista clínico, uno de los marcadores más ampliamente utilizado en estudios poblacionales para evaluar la resistencia a la insulina es el Índice de evaluación de resistencia a la insulina con el modelo homeostático (HOMA-IR) que se calcula a partir de los valores de glucosa e insulina en ayunas siguiendo la fórmula: $HOMA = (Glucosa \text{ en mg/dl} \times Insulina \text{ en mg/dl} / 405)$.

1.1.3.4. Disfunción de las células β pancreáticas

Para compensar los defectos en la señalización causados por la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, las células β pancreáticas aumentan más y más la secreción de insulina en un proceso conocido como función compensatoria de las células β , de manera que la resistencia a la insulina inicialmente provoca un aumento de los niveles circulantes de insulina. Sin embargo, cuando la situación se mantiene en el tiempo, el páncreas va sufriendo de manera progresiva un agotamiento de sus células β , que hace que finalmente sean incapaces de secretar suficiente insulina para mantener los niveles de glucosa dentro del rango fisiológico y se produce hiperglucemia y, finalmente, el desarrollo de DM2. Es importante mencionar que en poblaciones de alto riesgo de diabetes, como mujeres con síndrome de ovario poliquístico o familiares de primer grado de pacientes con diabetes, ya existe una disminución en la función de sus células β pancreáticas (Cnop *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 2018). Por lo tanto, y a pesar del indiscutible papel que ejercen la resistencia a la insulina y la disfunción de las células β pancreáticas sobre la patogénesis de la DM2, cuál de estos dos eventos aparece primero o es crítico para el proceso de la enfermedad sigue siendo un tema que genera gran controversia. Lo que sí está claro es que la aparición de la DM2 es un proceso heterogéneo en el que influyen, además de éstos, otros componentes patogénicos que son una combinación de factores genéticos y ambientales.

1.2. Manifestaciones clínicas de los pacientes con DM2

1.2.1. Sobrepeso y obesidad

En el momento en el que se diagnostica la DM2, la mayoría de los pacientes son obesos o tienen sobrepeso. La Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad define obesidad como un porcentaje de masa grasa superior al 25% en hombres y al 33% en mujeres. Cuando no está disponible la medida de la masa grasa, se considera obesidad si existe un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² o un perímetro de cintura (obesidad abdominal) \geq 102 cm en hombres o \geq 88 cm en mujeres (Lecube *et al.*, 2017).

La obesidad es considerada como un importante factor de riesgo para el desarrollo de la DM2. En este sentido, se ha demostrado que el IMC es el factor de riesgo individual más importante para la DM2 (Hu *et al.*, 2001), si bien es cierto que la distribución de la grasa corporal juega un papel importante, como se demuestra ya en el “Nurses Health Study”, donde observaron que la obesidad abdominal predice el riesgo de DM2 independientemente del IMC (Carey *et al.*, 1997). Los resultados del Programa de Prevención de Diabetes de Estados Unidos mostraron que intervenciones en el estilo de vida que reducían el peso corporal, disminuían el riesgo de DM2 en adultos obesos o con sobrepeso (Diabetes Prevention Program Research Group *et al.*, 2009).

El exceso calórico y la inactividad física, unidos a la predisposición genética, son importantes factores que condicionan el desarrollo de diabetes y obesidad. La acumulación excesiva de grasa da lugar a desequilibrios metabólicos entre los que destaca la resistencia a la insulina, nexo de unión entre la diabetes y la obesidad. El tejido adiposo constituye un órgano endocrino capaz de modular el metabolismo mediante la liberación de AGL, glicerol, citoquinas proinflamatorias y hormonas (Coelho *et al.*, 2013; Scherer, 2006). La obesidad da lugar a un aumento de los niveles de AGL en sangre y de la captación de los mismos por el tejido adiposo, músculo e hígado. Una vez activados, tras su unión a coenzima A, los ácidos grasos pueden ser almacenados, o bien ser oxidados en la mitocondria. Sin embargo, cuando el aporte de ácidos grasos es tal que se sobrepasa la capacidad de almacenamiento y oxidación, éstos y sus intermediarios (diacilglicerol, ceramida, ácido linoleico, etc.) se acumulan y desencadenan una serie de señales que inhiben la ruta de la insulina (Sears y Perry, 2015). Por ejemplo, a nivel muscular el aumento de AGL plasmáticos provoca resistencia a la insulina a través de una inhibición directa del transporte de glucosa mediado por insulina (Dresner *et al.*, 1999). Además, el aumento de AGL o sus metabolitos lipídicos activan una serie de serina/treonina quinasas que afectan negativamente a la acción de la insulina mediante la fosforilación de IRS-1

(Greene *et al.*, 2003). Por lo tanto, es evidente que los AGL juegan un papel fundamental en la sensibilidad a la insulina.

Por último, es importante señalar que en asociación con la obesidad se desarrolla un estado de inflamación crónica de bajo grado que se caracteriza por un aumento de los niveles del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), una citoquina proinflamatoria que inhibe la señalización de la insulina e induce resistencia a esta hormona mediante la inactivación y degradación de IRS-1 (Greene *et al.*, 2003), y cuya síntesis se encuentra elevada en el tejido adiposo de pacientes obesos. Estos aspectos se estudiarán con mayor detalle en la sección 1.3.1.

1.2.2. Alteración del control glucémico

El organismo, en condiciones normales, reacciona rápidamente a la ingesta de alimentos y a la actividad física a través de una red hormonal que controla el metabolismo glucídico para conseguir atenuar las hiperglucemias postprandiales, evitar las hipoglucemias, y mantener unos niveles adecuados de glucosa en sangre en condiciones de ayuno. En la DM2, debido principalmente a la resistencia a la insulina, la glucemia basal en ayunas se encuentra anormalmente aumentada. Cabe destacar que el control de la diabetes implica el mantenimiento de los niveles circulantes de glucosa dentro del rango fisiológico, que es fundamental para retrasar, minimizar y/o evitar la aparición de complicaciones de la diabetes. En este sentido, el parámetro más utilizado como medida objetiva del control glucémico es la hemoglobina glicosilada A_{1c} (HbA_{1c}), ya que proporciona información sobre los niveles medios de glucosa en sangre de las últimas 8-12 semanas (Nathan *et al.*, 2007). Los criterios establecidos por la Asociación Americana de Diabetes para el diagnóstico de diabetes están relacionados con el control glucémico y consisten en la presencia de al menos una de las siguientes condiciones: (i) valores de HbA_{1c} \geq 6,5%; (ii) niveles plasmáticos de glucosa en ayunas \geq 126 mg/dl; (iii) glucosa plasmática \geq 200 mg/dl a las 2 horas en la prueba de tolerancia oral a la glucosa; y (iv) niveles aleatorios de glucosa en plasma \geq 200 mg/dl (American Diabetes Association, 2018a).

Existe una correlación clara entre el control glucémico y el desarrollo de complicaciones vasculares. De hecho, diferentes estudios tanto observacionales como intervencionales, han demostrado que una reducción en los niveles de HbA_{1c} disminuye el riesgo y progresión de complicaciones de la diabetes. Por ejemplo, el Estudio Prospectivo de Diabetes de Reino Unido (UK Prospective Diabetes Study, UKPDS, (Stratton *et al.*, 2000)) demostró que, en pacientes con DM2, por cada 1% de disminución en los valores de HbA_{1c} se reducía el riesgo de

complicaciones microvasculares un 37%, el riesgo de mortalidad relacionada con la diabetes en un 21%, y el riesgo de infarto de miocardio un 14%. Además, observaron que los pacientes con menor riesgo eran aquellos que mantenían unos valores de HbA_{1C} inferiores a 7%. Por tanto, en el manejo de la DM2 de pacientes adultos, uno de los principales objetivos terapéuticos consiste en conseguir un buen control glucémico, o lo que es lo mismo, un nivel de HbA_{1C} en sangre < 7% según las guías de la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association, 2018b) o ≤ 6,5% según las recomendaciones del Colegio Americano de Endocrinología (Garber *et al.*, 2018).

1.2.2.1. Tratamientos antidiabéticos

En fases tempranas, el manejo de la DM2 implica modificaciones en la dieta y en el estilo de vida de los pacientes para que reduzcan su peso y aumenten su actividad física. Sin embargo, en el estudio UKPDS, solamente el 9% de los pacientes fueron capaces de mantener un buen control glucémico (niveles de HbA_{1C} ≤ 7%) tras 9 años de dieta, sin antidiabéticos orales ni insulina (Turner *et al.*, 1999). Por tanto, en la mayoría de los pacientes es necesario además el uso de fármacos antidiabéticos para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de los objetivos terapéuticos. La metformina es el tratamiento de primera línea en la mayoría de los pacientes con DM2, y su mecanismo de acción se explicará más adelante. Otras clases de antidiabéticos utilizados para el tratamiento de la DM2 son las sulfonilureas (fármacos que aumentan la secreción pancreática de insulina), las tiazolidinedionas (capaces de aumentar la sensibilidad a la insulina y la función de las células β pancreáticas), los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4, que bloquean la degradación de hormonas incretinas y, así, estimulan la secreción de insulina e inhiben la secreción de glucagón), los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (i-SGLT2, que inhiben la reabsorción de glucosa por el riñón y favorecen su excreción en la orina), los inhibidores de la α-glucosidasa (que retrasan la absorción intestinal de carbohidratos) y los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP1, que aumentan los niveles plasmáticos de GLP1, lo que da lugar a un aumento de la secreción de insulina y una inhibición de la secreción de glucagón). Sin embargo, y debido al progreso natural de la enfermedad, cuando las células β-pancreáticas se deterioran y se produce una deficiencia significativa en la secreción endógena de insulina los pacientes requieren el tratamiento con insulina para poder mantener un control glucémico adecuado.

1.2.2.1.1. Metformina: Mecanismo de acción

La metformina es el tratamiento antidiabético oral que más se prescribe a nivel mundial. Este fármaco ha sido ampliamente estudiado ya que no sólo disminuye los niveles de glucosa en

sangre y mejora la sensibilidad a la insulina, sino que también es capaz de disminuir el peso corporal, mejorar el perfil lipídico y los marcadores de inflamación, reduciendo el riesgo cardiovascular (Figura 3) (Andrews *et al.*, 2012; Salpeter *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2018). La acción antidiabética de esta biguanida consiste principalmente en un aumento de la acción de la insulina en hígado que reduce la gluconeogénesis hepática. Aunque también se ha visto que aumenta la captación de glucosa en músculo esquelético, retrasa ligeramente la absorción gastrointestinal de glucosa, incrementa los niveles de GLP1 y reduce las funciones del glucagón (Pernicova y Korbonits, 2014).

Desde el punto de vista molecular, la metformina actúa en la mitocondria inhibiendo el complejo I de la cadena de transporte de electrones, lo que provoca un cambio en el balance energético de la célula, donde desciende la producción de ATP y aumentan los niveles de AMP (Owen *et al.*, 2000; Yaribeygi *et al.*, 2018a). Como resultado, se activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), un regulador metabólico que promueve la acción de la insulina y reduce la gluconeogénesis hepática. Por otro lado, el aumento de los niveles de AMP inhibe la síntesis de AMP cíclico inducida por glucagón, lo que sugiere una inhibición de la señalización del glucagón que culmina con la reducción en los niveles de glucosa (Figura 3) (Miller *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2001).

La metformina parece ejercer efectos beneficiosos sobre el corazón y la vasculatura, de hecho, en el estudio UKPDS el tratamiento con este fármaco mostró una reducción en el riesgo de mortalidad cardiovascular del 36% (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998). De acuerdo con estos resultados, en otro ensayo clínico aleatorizado posterior, se demostraron los efectos beneficiosos de la metformina con respecto a placebo a nivel cardiovascular (Kooy *et al.*, 2009). Sin embargo, las mejoras en el control glucémico no son suficientes para explicar los beneficios cardiovasculares de la metformina observados en el UKPDS, sino que son el resultado de una combinación de efectos pleiotrópicos que ejerce la metformina sobre la vasculatura (Bailey *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, se ha visto que mejora la función endotelial, reduce la inflamación, disminuye el estrés oxidativo y tiene propiedades antiaterogénicas (Bailey *et al.*, 2007; de Jager *et al.*, 2014; Mather *et al.*, 2001; Pavlovic *et al.*, 2000). Sin embargo, actualmente no se conocen en detalle los mecanismos moleculares por los que la metformina mejora la función vascular, por lo que es necesario seguir realizando estudios que revelen el papel de la metformina en la vasculatura de los pacientes con DM2.

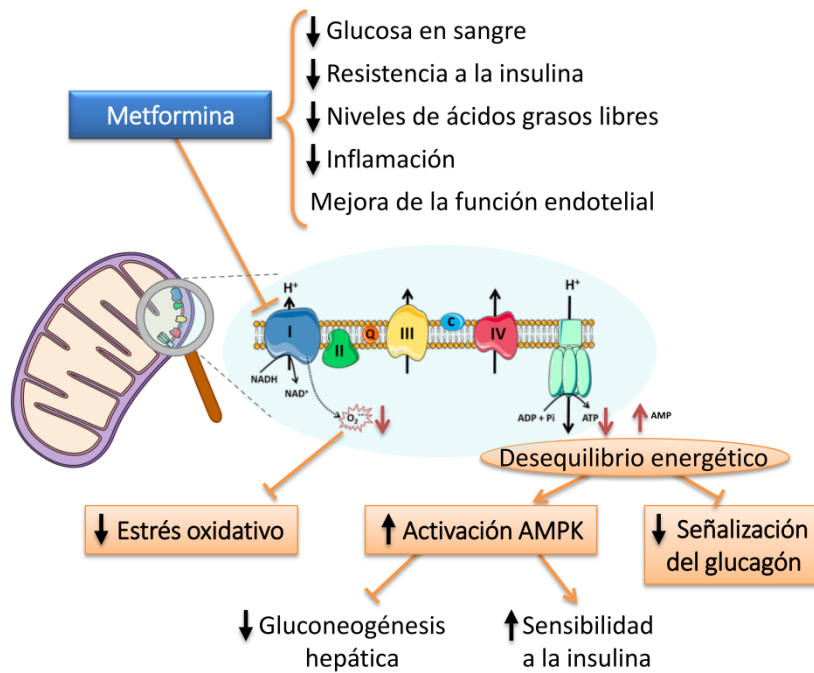


Figura 3. Efectos beneficiosos de la metformina y mecanismos de acción. La metformina reduce la glucemia basal, la resistencia a la insulina y los marcadores de inflamación. Además, mejora el perfil lipídico y la función endotelial. Este fármaco ejerce su acción a través de una inhibición del complejo I mitocondrial que provoca, por un lado, una disminución en la producción de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y, por otro, un desequilibrio en los niveles de ATP y AMP. Como consecuencia de la modificación en la carga energética celular, se reduce la señalización del glucagón, y se activa la AMP quinasa (AMPK), enzima clave en la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el aumento de la acción de la insulina en tejidos periféricos.

1.2.3. Dislipidemia aterogénica

Cuando nos referimos a dislipidemia, estamos describiendo una serie de anomalías cuantitativas y/o cualitativas de los lípidos y lipoproteínas con potencial acción aterogénica. Dependiendo de la causa, se clasifican en dislipidemias primarias, que tienen un origen genético, o secundarias, asociadas a otra enfermedad como la DM2. El metabolismo lipídico en pacientes con DM2 está alterado a causa de la resistencia a la insulina. La falta de la acción supresora de la insulina sobre la lipólisis en el tejido adiposo provoca la liberación de altos niveles de AGL y reduce la degradación hepática de apolipoproteína B (ApoB) (Haas *et al.*, 2013). Además, la resistencia a la insulina induce la activación de enzimas lipogénicas en el hígado que utilizan los AGL liberados para el ensamblaje y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) enriquecidas en triglicéridos y con alta capacidad aterogénica (Choi y Ginsberg, 2011). Paralelamente, el incremento de las VLDL ricas en triglicéridos aumenta la expresión de la proteína transferidora de ésteres de colesterol que, junto al aumento de la expresión de la

lipasa hepática que ocurre en pacientes con DM2, provoca un aumento de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas, y el descenso de partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Taskinen y Boren, 2015). Por lo tanto, la dislipidemia diabética consiste en una alteración del perfil lipídico en donde existe una hipertrigliceridemia acompañada de unos niveles reducidos de colesterol HDL (c-HDL), concentraciones elevadas de VLDL, presencia aumentada de partículas LDL pequeñas y densas e incremento de ApoB (Szalat *et al.*, 2016).

La dislipidemia aterogénica se considera uno de los factores de riesgo cardiovascular más importantes en la población diabética. De hecho, se ha visto que a niveles similares de colesterol LDL (incluso dentro de objetivo), aquellos pacientes con DM2 que presentan mayor proporción de partículas de LDL pequeñas y densas tienen más riesgo cardiovascular (Malave *et al.*, 2012). Los triglicéridos por sí mismos no están implicados en la formación de la placa de ateroma, pero sí que se ha demostrado que las lipoproteínas ricas en triglicéridos juegan un papel causal en el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (Do *et al.*, 2013). El c-HDL se encarga del transporte inverso de colesterol desde los tejidos al hígado, facilitando la retirada de colesterol de la pared arterial, y es por este motivo por lo que se correlaciona de manera inversa con el riesgo cardiovascular. En este sentido, en el estudio UKPDS observaron que el número de episodios cardiovasculares se veía reducido en un 15% cuando los niveles de c-HDL aumentaban 3,9 mg/dl (0,1 mmol/l) (Turner *et al.*, 1998).

Finalmente, es de destacar que el manejo de la dislipidemia diabética es clave para reducir las complicaciones cardiovasculares asociadas a la DM2. Además de las modificaciones en el estilo de vida (aumento de la actividad física, cambios en la dieta y abandono del hábito tabáquico), para conseguir las metas lipídicas recomendadas se suele precisar del tratamiento con agentes hipolipemiantes, donde los más comunes son las estatinas, fenofibratos o ezetimibe (Szalat *et al.*, 2016).

1.2.4. Hipertensión arterial

Se estima que aproximadamente dos tercios de los pacientes con DM2 son hipertensos. La hipertensión, definida como valores elevados de presión arterial ($\geq 140/90$ mmHg), contribuye al desarrollo de complicaciones macro y microvasculares por lo que su tratamiento y control en pacientes con DM2 es fundamental para reducir el riesgo de morbilidad asociado (Adler *et al.*, 2000; Pavlou *et al.*, 2018; Petrie *et al.*, 2018).

Se han propuesto muchos mecanismos que explicarían la conexión entre DM2 e hipertensión. Por ejemplo, la obesidad y la acumulación de grasa visceral han sido sugeridos como importantes factores patogénicos que influyen en la hipertensión, al promover una activación inapropiada del sistema renina-angiotensina (Boustany *et al.*, 2004; Sowers, 2013). La hipertensión se caracteriza por disfunción endotelial y aumento en la resistencia vascular periférica, condiciones que están relacionadas con la resistencia a la insulina presente en la DM2. La falta de acción de la insulina en el endotelio vascular provoca estrés oxidativo, aumento de la expresión de moléculas de adhesión, inflamación y un descenso de la producción de óxido nítrico (NO), que finalmente pueden dar lugar a vasoconstricción, un aumento de la rigidez vascular y, consecuentemente, hipertensión (Muniyappa y Quon, 2007; Smulyan *et al.*, 2016).

Por lo tanto, en el manejo de la DM2 es importante incluir un control de los factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión arterial, que permita mantenerlos dentro de los rangos óptimos y, de esta manera, minimizar el desarrollo de complicaciones macro y microvasculares.

1.3. Mecanismos asociados al riesgo cardiovascular

Hasta ahora, hemos visto, de una manera general, las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con DM2. Para entender, desde un punto de vista fisiológico lo que se esconde detrás de esas manifestaciones clínicas, a lo largo de este apartado vamos a revisar los principales mecanismos moleculares que subyacen a la DM2 y participan en el aumento del riesgo cardiovascular.

1.3.1. Respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado

Las alteraciones metabólicas que acontecen en los inicios de la DM2 se relacionan con cambios en el sistema inmune innato que implican niveles alterados de citoquinas proinflamatorias. Este fenómeno es ampliamente conocido como inflamación sistémica de bajo grado y tiene un papel importante en la patogénesis de la DM2. De hecho, la DM2 puede ser clasificada como una enfermedad inflamatoria (Donath y Shoelson, 2011) y, en la literatura, se pueden encontrar estudios que demuestran aumentos en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y proteínas de fase aguda –como la proteína C reactiva (PCR)– en pacientes con DM2 (Herder *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 1997; Spranger *et al.*, 2003); que son, principalmente, resultado de la activación de adipocitos, células inmunitarias y hepatocitos (Donath y Shoelson, 2011). Además, se ha visto que la administración intravenosa de TNF- α en individuos sanos induce resistencia a la insulina, señalando el importante papel regulatorio de la inflamación sobre la patogénesis de la DM2 (Krogh-Madsen *et al.*, 2006).

En relación a la respuesta inflamatoria, se cree que tiene su origen en el tejido adiposo y que estaría relacionada con la obesidad. El balance energético positivo, cuando permanece en el tiempo y se cronifica, da lugar a una expansión del tejido adiposo, hipertrofia de los adipocitos y, finalmente, liberación de señales que favorecen el reclutamiento e infiltración de macrófagos (Surmi y Hasty, 2008). Este escenario favorece la secreción de citoquinas proinflamatorias (también conocidas como adipoquinas cuando son liberadas por el tejido adiposo), como el TNF- α o la interleuquina 6 (IL-6, que induce la expresión hepática de PCR). Las citoquinas, al igual que el exceso de ácidos grasos saturados, activan las rutas de señalización de la quinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK), la de la proteína quinasa C (PKC), o el inhibidor de la subunidad β de la quinasa de NF- κ B (IKK β) (Boucher *et al.*, 2014), que conducen finalmente a la fosforilación en residuos de serina de los IRS, lo que disminuye su afinidad por el IR, mitigando la transducción de la señal a través de la ruta de la insulina (Hotamisligil, 2003; van Greevenbroek *et al.*, 2013). Por otro lado, la fosforilación de de IKK β permite la liberación de NF- κ B, que es translocado al

núcleo donde promueve la expresión de moléculas proinflamatorias y de numerosos genes diana cuyos productos inducen resistencia a la insulina (Shoelson *et al.*, 2006).

Además de éstos, existen otros mecanismos a través de los cuales el aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de adipocitos y células inmunitarias causa resistencia a la insulina. Por ejemplo, el tratamiento crónico de adipocitos humanos con la citoquina proinflamatoria interleuquina 1 β (IL-1 β) disminuyó la expresión de IRS-1 provocando una disminución en la expresión y en la translocación a la membrana plasmática del receptor de glucosa dependiente de insulina GLUT-4 (Jager *et al.*, 2007). De acuerdo con estos resultados, se ha visto que TNF- α e IL-6 también están implicadas en la disminución de la expresión de GLUT-4 (Rotter *et al.*, 2003).

La respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado, además de alterar la señalización de la ruta de la insulina, afecta a la función de las células β del páncreas (van Greevenbroek *et al.*, 2013). Por ejemplo, bajo condiciones de hiperglucemia se produce un aumento de las concentraciones de IL-1 β que promueve el deterioro de las células β al inducir la apoptosis a través de la ruta de FAS (Maedler *et al.*, 2002).

Las rutas de señalización de NF- κ B y JNK juegan un papel central en la señalización proinflamatoria y se ha visto que están activadas en múltiples tejidos en DM2 y obesidad (Donath y Shoelson, 2011). Por ejemplo, en el hígado, la vía de NF- κ B se activa por dietas ricas en grasa y obesidad, dando lugar a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β que afectan directamente a la resistencia a la insulina tanto a nivel local como sistémico (Cai *et al.*, 2005). De manera inversa, debemos destacar el papel que la resistencia a la insulina puede tener sobre la inflamación crónica. En este sentido, se ha descrito que la insulina por sí misma tiene propiedades antiinflamatorias (Dandona *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). De hecho, Dandona y colaboradores demostraron que la infusión de una dosis baja de insulina (2 - 2,5 UI/h) en pacientes obesos no diabéticos disminuía la expresión intranuclear de NF- κ B y aumentaba la expresión proteica de su inhibidor IKK β en células mononucleares, además de suprimir en estas células la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y disminuir las concentraciones plasmáticas de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) (Dandona *et al.*, 2001). Por lo tanto, nos encontramos ante un círculo vicioso en el que, por un lado, la inflamación altera la acción de la insulina y, por otro lado, la resistencia a la insulina puede promover inflamación crónica.

El aumento de marcadores inflamatorios circulantes está asociado con el riesgo de desarrollar enfermedades micro- y macrovasculares (Lowe *et al.*, 2014). Así, por ejemplo, se ha descrito que IL-6 juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad coronaria (Yudkin *et al.*, 2000), y los niveles de PCR se consideran un importante marcador en la predicción de eventos cardiovasculares (Emerging Risk Factors Collaboration *et al.*, 2012). Cabe destacar, por último, el estudio de Dalla Vestra y colaboradores, que sugiere el papel primordial de la inflamación sobre la patogénesis de la nefropatía diabética al demostrar una asociación entre el aumento de marcadores inflamatorios de fase aguda, IL-6 y PCR, y un engrosamiento de la membrana basal glomerular (Dalla Vestra *et al.*, 2005).

1.3.2. Disfunción endotelial

La disfunción endotelial constituye uno de los eventos clave en el inicio de los procesos inflamatorios que se asocian con las complicaciones vasculares en los pacientes con DM2 (Dhananjayan *et al.*, 2016). El endotelio es la capa interna de la pared de los vasos sanguíneos y participa en la homeostasis vascular mediante la modulación del flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular, la proliferación y migración de las células de músculo liso, la fibrinólisis y coagulación, la inflamación y la adherencia de leucocitos y plaquetas, entre otras. Además, el endotelio se encarga de mantener el tono vascular mediante la producción de sustancias con capacidad vasodilatadora (como el NO y la prostaciclina), y vasoconstrictora (como la endotelina 1 y la angiotensina II). Bajo condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre la producción y la liberación de los factores vasodilatadores y vasoconstrictores. Sin embargo, la disfunción endotelial ocurre cuando se produce un desequilibrio en este balance que predispone a la vasculatura a sufrir efectos protrombóticos y proaterogénicos. Como resultado se produce vasoconstricción, activación plaquetaria, adhesión leucocitaria, estrés oxidativo, inflamación, proliferación celular en las paredes vasculares, alteración de la coagulación y, finalmente, aterosclerosis y trombosis (Carrizzo *et al.*, 2018; Su, 2015).

El NO juega un papel crucial en el desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis, puesto que, además de su actividad vasodilatadora, es capaz de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión leucocitarias. Esta molécula es sintetizada en las células endoteliales por la enzima NO sintetasa endotelial (eNOS); y, cuando las concentraciones de los sustratos y cofactores para la síntesis de NO son bajas, la eNOS puede desacoplarse y dar lugar a la producción de ERO. Además, cuando existe una alta concentración de ERO –por ejemplo, en condiciones de hiperglucemia, inflamación o resistencia a la insulina–, el NO reacciona con ellos para formar peroxinitrito, exacerbando así el estrés

oxidativo y promoviendo el desacoplamiento de la eNOS (Dhananjayan *et al.*, 2016). La hiperglucemia provoca daño vascular al promover un desequilibrio entre la biodisponibilidad de NO y la acumulación de ERO, por lo que es considerada como uno de los principales factores implicados en el desarrollo de disfunción endotelial en pacientes con DM2 (Kaur *et al.*, 2018). Además, la insulina está implicada en la producción de NO mediante la activación de la eNOS a través de la ruta de señalización dependiente de PI3K, por lo que bajo condiciones de resistencia a la insulina, donde la ruta PI3K se ve alterada, la producción de NO se ve comprometida, contribuyendo de esta manera a la disfunción endotelial observada en la DM2 (Kim *et al.*, 2006).

1.3.3. El proceso aterosclerótico

La resistencia a la insulina, la hiperglucemia y la dislipidemia favorecen una alteración del entorno metabólico que afecta a la pared vascular por medio de una serie de acontecimientos, como la disfunción endotelial, el estrés oxidativo y la inflamación sistémica de bajo grado, entre otros. La activación de estos eventos aumenta la vasoconstricción, favorece el desarrollo de aterosclerosis, y promueve la formación de trombos (Kaur *et al.*, 2018). La aterosclerosis es una enfermedad crónica de origen inflamatorio que provoca una acumulación incontrolada de lípidos en la pared arterial. Como consecuencia, la luz del vaso sanguíneo se va reduciendo hasta el punto que puede llegar a ocluirse y provocar un proceso isquémico en el tejido adyacente.

El proceso aterosclerótico (Figura 4) comienza por una disfunción endotelial y alteraciones estructurales de la pared de los vasos sanguíneos que favorece la acumulación de LDL en el espacio subendotelial, donde son oxidadas por ERO o por enzimas como mieloperoxidasa o lipooxigenasas liberadas por células inflamatorias (Weber y Noels, 2011). Los pacientes diabéticos sufren cambios cualitativos en las partículas LDL, aumentándose la proporción de partículas LDL pequeñas y densas. Éstas son especialmente proaterogénicas, ya que atraviesan más fácilmente la pared endotelial y son más susceptibles de oxidación (Chait *et al.*, 1993; Ivanova *et al.*, 2017). Las LDL oxidadas estimulan la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas por parte de las células endoteliales, hecho que induce un reclutamiento e infiltración de leucocitos (principalmente monocitos) a la pared arterial. Una vez allí, los monocitos se diferencian a macrófagos, que comienzan a captar y acumular las LDL oxidadas convirtiéndose en células espumosas. Si en el espacio subendotelial hay un exceso de colesterol, la capacidad de acumulación de los macrófagos se ve sobrepasada y las células espumosas entran en apoptosis y mueren, liberando su contenido intracelular que queda

retenido en la pared del vaso. Este efecto induce una reacción inflamatoria que atrae más macrófagos a la zona de la lesión, pudiendo generar de esta manera una placa de ateroma (Weber y Noels, 2011). Las placas de ateroma generalmente están cubiertas por una capa fibrosa compuesta por colágeno, proteoglicanos y células de músculo liso. A medida que la lesión aterosclerótica va evolucionando, el potencial inflamatorio aumenta y se favorece la proliferación de células de músculo liso, por lo que la placa se va ensanchando y puede dar lugar a la oclusión del vaso o, en caso de ruptura, a la formación de trombos (Badimon y Vilahur, 2014). Cuando las arterias afectadas son las coronarias el resultado de este proceso puede dar lugar a angina o infarto agudo de miocardio.

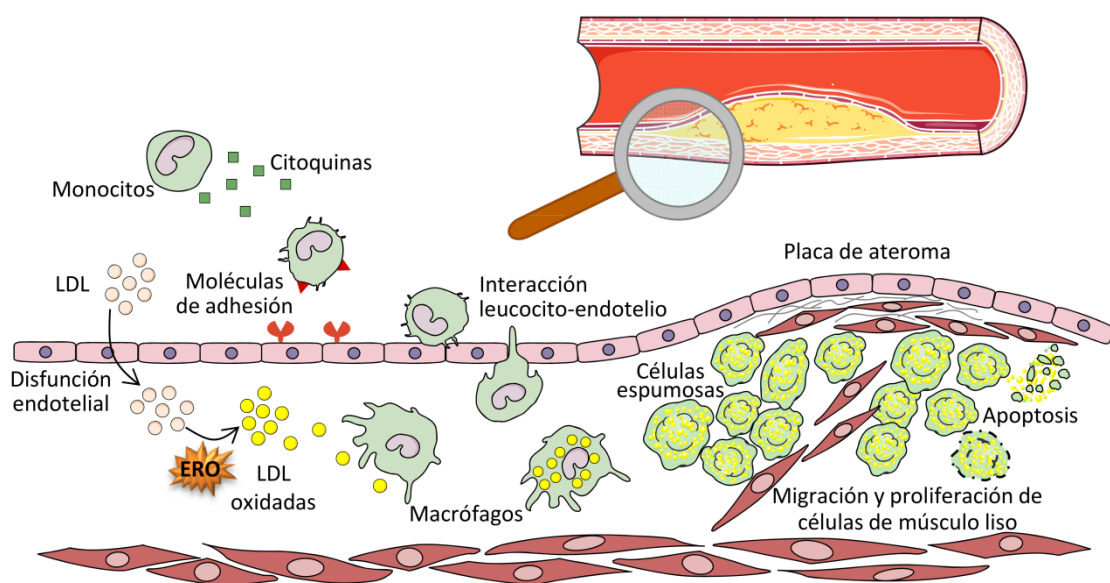


Figura 4. Patogénesis del proceso aterosclerótico. Cuando el endotelio está dañado permite el paso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son oxidadas en el espacio subendotelial por especies reactivas de oxígeno (ERO). Paralelamente, las células endoteliales liberan citoquinas y expresan en su superficie moléculas de adhesión, lo que atrae a los leucocitos hacia la pared vascular. Los leucocitos ruedan sobre el endotelio hasta que se adhieren firmemente, lo atraviesan, y es entonces cuando se diferencian a macrófagos y comienzan a fagocitar LDL oxidadas para convertirse en células espumosas, que se acumulan en la pared del vaso hasta que su capacidad de almacenamiento de lípidos se ve sobrepasada. Finalmente, mueren por apoptosis y liberan su contenido, lo que desencadena una reacción inflamatoria exacerbada. En este proceso existe también migración y proliferación de células de músculo liso, y una acumulación de fibras de colágeno, que recubre la placa de ateroma. ERO, especies reactivas de oxígeno; LDL, lipoproteínas de baja densidad.

Aunque histológicamente la evolución de la aterosclerosis en los pacientes con DM2 no es diferente a la de personas sin diabetes, sí que es cierto que la resistencia a la insulina, la

hiperglucemia y la inflamación presentes en la DM2 aceleran y acentúan el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

1.3.4. Interacción leucocito-endotelio

La inflamación y la activación del sistema inmune innato están íntimamente relacionadas con la patogénesis de la diabetes (Pickup, 2004) y muchos de los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de esta enfermedad están mediados por leucocitos. Los leucocitos son células inmunitarias que participan activamente en la respuesta inflamatoria y en el proceso aterosclerótico. Varios estudios han señalado la importancia que la activación crónica del sistema inmunitario podría desempeñar en el desarrollo de resistencia a la insulina (Shiny *et al.*, 2014; Vozarova *et al.*, 2002). Un relevante estudio llevado a cabo en 2005 por Arkan y colaboradores señaló que la expresión de la proteína IKK β en los leucocitos de ratones obesos o sometidos a una dieta rica en grasas es responsable del desarrollo de resistencia a la insulina sistémica (Arkan *et al.*, 2005), dejando así constancia del importante papel que juega la activación de la cascada inflamatoria de las células inmunes sobre la resistencia a la insulina.

Este tipo celular no es solo crucial en el desarrollo de resistencia a la insulina, sino que participa en las primeras etapas del proceso aterogénico. Los leucocitos que circulan en el torrente sanguíneo son reclutados hacia la pared vascular e inician la respuesta inflamatoria y extravasación leucocitaria (Figura 4). Este fenómeno consiste en un proceso secuencial que tiene lugar en tres etapas principales: (i) Rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio, (ii) adhesión firme y (iii) transmigración endotelial. En respuesta a un estímulo inflamatorio, las células endoteliales liberan citoquinas y expresan en su superficie moléculas de adhesión que atraen a los leucocitos circulantes, de forma que éstos se aproximan y establecen contacto con el endotelio activado. Las selectinas son las proteínas de adhesión encargadas del primer contacto leucocito-endotelio (Langer y Chavakis, 2009), en concreto, la L-selectina (que se expresa constitutivamente en la superficie de los leucocitos) y la E-selectina (en las células endoteliales activadas). Tras las fases de atracción y captura, los leucocitos comienzan a rodar sobre la superficie endotelial y van disminuyendo su velocidad hasta que se paran y se produce la adhesión. El proceso de rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio está controlado principalmente por la P-selectina expresada en las células endoteliales, mientras que la adhesión firme ocurre tras la interacción de las integrinas (localizadas en la membrana de los leucocitos) con sus receptores en las células endoteliales (moléculas de adhesión intercelular, ICAM, y moléculas de adhesión vascular, VCAM) (Langer y Chavakis, 2009; Ley *et al.*, 2007). Por último, y mediante la acción de ICAM y PECAM (molécula de adhesión plaqueto-endotelial),

entre otras, los leucocitos adheridos atraviesan el endotelio en un proceso conocido como extravasación o diapédesis que les permite migrar hacia el foco de infección (Muller, 2013).

Las moléculas de adhesión celular (CAM) pueden sufrir una escisión proteolítica y ser liberadas a la circulación como formas solubles (sCAM) (Leeuwenberg *et al.*, 1992), cuyos niveles pueden ser fácilmente evaluados en muestras de suero o plasma y reflejan la expresión celular de CAM. Numerosos estudios han demostrado que los pacientes con DM2 presentan elevadas concentraciones séricas de moléculas de adhesión en comparación con sujetos sanos (Boulbou *et al.*, 2005; Hernandez-Mijares *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2016), lo que contribuye a que sus leucocitos experimenten más interacciones con el endotelio, pudiendo finalmente favorecer el desarrollo temprano de aterosclerosis y de complicaciones vasculares. Estos procesos están relacionados con el aumento en el estrés oxidativo observado en la DM2. En este sentido, la hiperglucemia provoca un descenso en los niveles de NO, un aumento del estrés oxidativo y una activación de los receptores de productos avanzados de glucosilación (RAGE), lo que promueve la activación de NF- κ B y la proteína activadora 1 (AP-1), factores de transcripción que regulan la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas y proteínas proinflamatorias implicadas en la aterogénesis (Beckman *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2018). Además, aumentos en los niveles de VLDL y AGL (como los que se observan típicamente en los pacientes con DM2) también aumentan la expresión de NF- κ B en las células endoteliales con la subsecuente expresión de citoquinas y moléculas de adhesión que promueven el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Dichtl *et al.*, 1999).

En la actualidad, existen métodos que permiten evaluar y cuantificar las interacciones de los leucocitos con el endotelio vascular tanto “*in vivo*” –mediante técnicas de imagen intravital en animales de experimentación (Jain *et al.*, 2013)– como “*ex vivo*” –mediante el uso de cámaras de flujo paralelo que permiten perfundir una suspensión aislada de leucocitos sobre una monocapa de células endoteliales (Ling *et al.*, 2003). Dada la importancia de las interacciones leucocito-endotelio en el inicio del proceso aterosclerótico, el estudio de los mecanismos y las moléculas implicadas en estos procesos permitirá conocer con mayor detalle el papel que juegan la DM2 y otras enfermedades metabólicas en el desarrollo de aterosclerosis y las enfermedades vasculares asociadas, además de facilitar el diseño de estrategias y fármacos capaces de prevenir y retrasar la aparición de aterosclerosis y sus consiguientes complicaciones.

1.4. Consecuencias de la DM2: Complicaciones vasculares asociadas

Como hemos visto en los apartados anteriores, las alteraciones metabólicas características de la DM2 desencadenan procesos moleculares que contribuyen a la disfunción vascular. Las consecuencias de estas alteraciones resultan en el desarrollo de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, que dependiendo del tamaño de los vasos afectados pueden ser clasificadas en complicaciones microvasculares (principalmente cuando se dañan vasos de la microvasculatura capilar del riñón, el ojo o el sistema nervioso) o macrovasculares (si se ven afectados vasos de mayor calibre como las arterias coronarias). Las complicaciones vasculares son muy comunes entre los pacientes con DM2, de hecho un estudio observacional llevado a cabo sobre más de 65.000 participantes de 28 países diferentes reveló que aproximadamente la mitad de los pacientes presentaban complicaciones microvasculares y un 27% poseían complicaciones macrovasculares (Litwak *et al.*, 2013). Además, se estima que las personas diabéticas tienen un riesgo relativo de desarrollar complicaciones microvasculares 10-20 veces mayor que las personas sin diabetes, y que el riesgo relativo es 2-4 veces mayor para el desarrollo de complicaciones macrovasculares (Gregg *et al.*, 2016). La presencia y progresión de complicaciones vasculares limita la calidad de vida de los pacientes con DM2 y puede llegar a producir daños irreversibles o, en el peor de los casos, la muerte. Por todo ello, el entendimiento de los mecanismos moleculares que están asociados al desarrollo de estas complicaciones es fundamental mejorar la calidad de vida de los pacientes con DM2.

1.4.1. Complicaciones microvasculares de la DM2

Las complicaciones microvasculares de la diabetes incluyen la nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética, y están íntimamente relacionadas con la duración y severidad de la hiperglucemia (Chawla *et al.*, 2016; Holman *et al.*, 2008). Aunque en un paciente con DM2 todas sus células están expuestas a niveles elevados de glucosa, la hiperglucemia afecta especialmente a aquellas células que son incapaces de regular su captación, como son las células mesangiales del glomérulo renal, las células endoteliales que conforman los capilares de la retina, las neuronas y las células de Schwann de los nervios periféricos (Brownlee, 2001; Kaiser *et al.*, 1993). De forma que es la hiperglucemia intracelular la que causa el daño en estas células y desencadena el desarrollo de nefropatía, retinopatía y neuropatía respectivamente. Los mecanismos moleculares implicados en estos procesos se cree que son consecuencia de la producción excesiva de ERO que tiene lugar bajo condiciones de hiperglucemia (Brownlee, 2005). Además de la hiperglucemia, la hipertensión, la predisposición genética, la hiperlipidemia y la obesidad son también importantes factores de riesgo que participan en el desarrollo de complicaciones microvasculares (Khanam *et al.*, 2017; van Leiden *et al.*, 2002).

Las complicaciones microvasculares son más frecuentes en la población diabética que las macrovasculares, de hecho, las cifras de prevalencia de estas complicaciones rondan el 20-40 % para la nefropatía (Gheith *et al.*, 2015; Molitch *et al.*, 2004), aproximadamente el 30 % para la retinopatía (Ruta *et al.*, 2013) y entre el 13 y el 45 % en el caso de la neuropatía (van Dieren *et al.*, 2010). Constituyen la principal causa de enfermedad renal terminal, ceguera y amputación de miembros en extremidades inferiores, respectivamente. En este sentido, es particularmente importante la nefropatía diabética (definida como albuminuria y proteinuria persistente y/o descenso mantenido en el tiempo de la tasa de filtrado glomerular estimado) ya que aproximadamente un 10% de las muertes entre los pacientes con DM2 se deben a fallo renal (van Dieren *et al.*, 2010).

1.4.2. Complicaciones macrovasculares de la DM2

La DM2 afecta también a los vasos de mayor calibre, como las arterias que irrigan el corazón, el cerebro y las extremidades inferiores, dando lugar a enfermedades cardiovasculares entre las que destacan la cardiopatía coronaria, angina, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica e insuficiencia cardíaca. En comparación con las personas no diabéticas, los pacientes con DM2 tienen el doble de probabilidades de desarrollar enfermedad cardiovascular, independientemente de su IMC, presión arterial sistólica, edad y del hábito tabáquico (Emerging Risk Factors Collaboration *et al.*, 2010). Además, el desarrollo de enfermedad cardiovascular ocurre 14,6 años antes que en personas no diabéticas (Beckman *et al.*, 2013) y provoca la muerte del 50% de los pacientes con DM2 (van Dieren *et al.*, 2010), constituyendo la principal causa de mortalidad y morbilidad asociada a la DM2.

En la fisiopatología de las complicaciones macrovasculares de la diabetes el desarrollo precoz de lesiones ateroscleróticas desempeña un papel primordial. Este proceso se ve favorecido y acelerado por la resistencia a la insulina, la hiperglucemia y la inflamación crónica. La aterosclerosis conduce al estrechamiento de las paredes arteriales en el sistema vascular periférico o coronario, debido a la formación de lesiones ateroscleróticas ricas en lípidos que están rodeadas por una capa fibrosa. La ruptura de estas lesiones puede desencadenar fatales consecuencias como el infarto vascular agudo (Boyle, 2007). En la DM2 existe también un aumento de la adhesión plaquetaria y una mayor tendencia a la coagulación sanguínea (hipercoagulabilidad). En este sentido, el descenso en los niveles de NO, el aumento de la formación de ERO en las plaquetas y la alteración en la regulación del calcio promueven agregación plaquetaria. Este aumento de la coagulabilidad, junto con los cambios en la fibrinólisis debidos a los niveles elevados de PAI-1 en pacientes diabéticos, incrementan aún

más el riesgo de oclusión vascular y eventos cardiovasculares en la DM2 (Kaur *et al.*, 2018; Kearney *et al.*, 2017). Todo ello, unido a los otros factores de riesgo cardiovascular descritos con anterioridad, hace que en el manejo del paciente diabético sea de primordial importancia el control intensivo de los niveles de glucosa y lípidos circulantes, junto con un control estricto de la tensión arterial y del peso corporal para minimizar el riesgo de complicaciones y el progreso de la enfermedad.

1.5. Mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la DM2

1.5.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de moléculas con capacidad pro-oxidante (radicales libres) y las defensas antioxidantes, que puede desembocar en daño en los tejidos donde se produce. Es considerado como uno de los principales factores responsables del inicio y progresión de la DM2 y sus complicaciones asociadas. Para poder entender cómo influye el estrés oxidativo en el desarrollo de resistencia a la insulina y en la alteración de la secreción insulínica por parte de las células β -pancreáticas, necesitamos abordar el papel desempeñado por las ERO en la célula sana y los mecanismos involucrados en la pérdida del equilibrio que desencadenan la alteración del estado redox en la célula.

1.5.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

La formación de ERO ocurre por la reducción de oxígeno molecular (O_2) o por la oxidación de moléculas de agua (H_2O), que resultan en la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$). Las ERO son moléculas esenciales en la señalización celular y, cuando son producidas en cantidades moderadas, desempeñan un importante papel en respuestas celulares fisiológicas. Sin embargo, cuando su producción es excesiva, desencadenan reacciones que promueven la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y moléculas de ADN, causando importantes daños celulares (Valko *et al.*, 2007). En la célula existen dos fuentes principales de ERO, la mitocondria y la NADPH oxidasa (NOX). En contraposición, y para minimizar el daño celular oxidativo, bajo condiciones fisiológicas, los niveles de ERO son controlados por sistemas antioxidantes endógenos.

1.5.1.2. La mitocondria como fuente de ERO

1.5.1.2.1. El proceso de la fosforilación oxidativa

La mitocondria es la principal fuente de energía de la célula. En ella tiene lugar la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, proceso que es llevado a cabo por la cadena de transporte de electrones situada en la membrana mitocondrial interna. La oxidación de glucosa por la glucólisis genera NADH y piruvato. El piruvato es transportado a la mitocondria para ser oxidado a través del ciclo de Krebs produciendo CO_2 , H_2O , NADH y $FADH_2$. Por otra parte, la β -oxidación de los ácidos grasos produce acetil-CoA (que puede entrar en el ciclo de Krebs), NADH y $FADH_2$. Son estas dos últimas moléculas las que proporcionan los electrones para la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa.

En la cadena de transporte de electrones, el flujo de electrones es mediado por cuatro complejos enzimáticos (I-IV) anclados a la membrana mitocondrial interna, más la ubiquinona y el citocromo C. La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV promueve un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial, generando un gradiente electroquímico de protones que mantiene el potencial de membrana mitocondrial y es utilizado por la ATP sintetasa (o complejo V) para catalizar la síntesis de ATP a partir de la fosforilación de ADP (Figura 5).

1.5.1.2.2. Generación de ERO mitocondriales

Durante el proceso de fosforilación oxidativa los electrones procedentes de NADH o FADH₂ son transferidos al O₂ en una reacción que genera H₂O. Sin embargo, una pequeña proporción de electrones no atraviesa completamente la cadena respiratoria, sino que son transferidos directamente al O₂, que es convertido en O₂^{•-}, sin producción de ATP (Figura 5). De esta forma, entre un 0,2% y un 2% del O₂ consumido por las células se utiliza para la producción de ERO en un proceso que ocurre principalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (Balaban *et al.*, 2005). En mitocondrias aisladas se ha visto que la tasa más alta de producción de O₂^{•-} ocurre de manera predominante en el complejo I mitocondrial y tiene lugar principalmente bajo dos situaciones: (i) cuando la mitocondria no está generando ATP (debido a que hay poca demanda y, por tanto, una baja tasa de respiración) y, consecuentemente, tiene un elevado gradiente electroquímico de protones y un pool de coenzima Q altamente reducido que promueve el transporte reverso de electrones; (ii) cuando el ratio NADH/NAD⁺ en la matriz mitocondrial está aumentado (Murphy, 2009). Ambas situaciones pueden darse en la célula cuando hay, por ejemplo, un exceso en el aporte calórico y un gasto energético escaso como ocurre en la DM2 y la obesidad.

El O₂^{•-} es el precursor de todas las ERO y, debido a que es una molécula muy reactiva, el O₂^{•-} es rápidamente convertido a H₂O₂ por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y éste a su vez puede entonces ser reducido a [•]OH por iones metálicos de cobre o hierro (Figura 5) (Jackson *et al.*, 2002).

1.5.1.3. Generación de ERO no mitocondriales

Aunque la mayor parte de ERO son generadas en la mitocondria, en la célula existen otras fuentes importantes de radicales libres, como las enzimas ciclooxigenasa, NO sintetasa, xantina oxidasa, lipooxigenasa, ubiquinona, etc.; que durante sus respectivas actividades enzimáticas dan lugar a la producción de ERO como subproducto. Sin embargo la principal fuente de ERO no

mitocondriales es la NOX, un complejo multienzimático situado en la membrana plasmática que cataliza la producción de $O_2^{\cdot-}$ a partir de la reducción de un electrón de la molécula de O_2 utilizando NAD(P)H como donador de electrones (Figura 5) (Bedard y Krause, 2007). Aunque históricamente se descubrió en células fagocíticas por su papel fundamental en la inmunidad innata al ser responsable de la generación de ERO como defensa oxidativa frente a patógenos invasores (Segal y Jones, 1978), posteriormente se ha visto que algunos miembros de la familia de las NOX se expresan en otros tipos celulares y participan en funciones muy diversas. Por ejemplo, su expresión en las células de la pared vascular, como células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos adventicios, ha puesto de manifiesto a la NOX como un importante regulador del tono vascular (Manea *et al.*, 2015). Por lo tanto, una actividad exacerbada de esta enzima puede dar lugar a estrés oxidativo y desembocar en el desarrollo de enfermedades como hipertensión y aterosclerosis (Santillo *et al.*, 2015).

1.5.1.4. Defensas antioxidantes

Para prevenir y combatir los efectos nocivos del exceso de ERO existen eficientes mecanismos de defensa contra el daño oxidativo (Figura 5). En general, hay dos categorías de sistemas antioxidantes: pequeñas moléculas con capacidad reductora (glutati6n, vitamina E, 6cido asc6rbico, 6cido 6rico), y prote6nas redox (peroxidasas, super6xido dismutasa, catalasa, glutati6n reductasa, tioredoxinas, etc.).

El glutati6n es la mol6cula antioxidante no proteica m6s abundante en las c6lulas. Posee dos estados, una forma reducida (GSH) y otra oxidada (GSSG), de manera que el ratio GSH/GSSG puede utilizarse como indicador de estr6s oxidativo y medida del potencial redox. La enzima glutati6n reductasa (GR) cataliza la reducci6n de GSSG a GSH. El GSH puede neutralizar radicales libres directamente o actuar como sustrato para las enzimas glutati6n peroxidasa (GPX) o glutati6n S-transferasa (GST) durante la detoxificaci6n de H_2O_2 y per6xidos lip6dicos (Deponte, 2013). La SOD es una enzima fundamental en la dismutaci6n del i6n $O_2^{\cdot-}$, convirti6ndolo en H_2O_2 y O_2 . Existen tres isoformas de esta enzima: CuZn-SOD (localizada en el citosol, tambi6n conocida como SOD1), Mn-SOD (SOD2, en la matriz mitocondrial) y EC-SOD (SOD3, en el espacio extracelular). Es de destacar su papel en la protecci6n de la vasculatura (Fukai y Ushio-Fukai, 2011). Finalmente, la enzima catalasa (CAT) se encarga de procesar enzim6ticamente el H_2O_2 para producir O_2 y H_2O , neutralizando as6 esta mol6cula altamente reactiva.

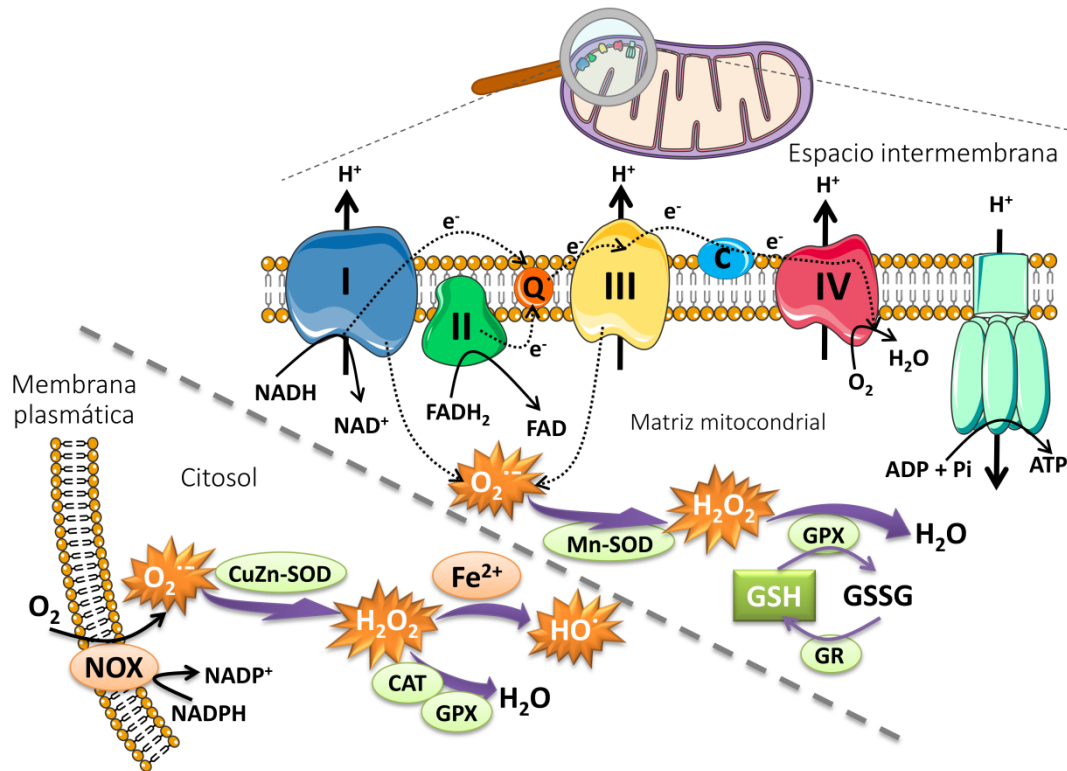


Figura 5. Producción y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En la cadena de transporte de electrones mitocondrial el flujo de electrones (procedentes del NADH y FADH₂ derivados de la glucólisis y la β-oxidación de ácidos grasos) a través de los complejos mitocondriales genera un gradiente electroquímico de protones que es utilizado por la ATP sintetasa para la producción de ATP. La fuga de electrones que ocurre en determinadas ocasiones en los complejos I y III da lugar a la generación de superóxido (O₂^{•-}). Esta molécula altamente reactiva es transformada en la matriz mitocondrial por la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que es convertido en H₂O por la glutatión peroxidasa (GPX) en un proceso en el que se oxida glutatión en su forma reducida (GSH) a su forma oxidada (GSSG). La reducción de GSSG a GSH es llevada a cabo por la enzima glutatión reductasa (GR). Por otro lado, en el citosol, la superóxido dismutasa citosólica (CuZn-SOD) convierte rápidamente en H₂O₂ el O₂^{•-} generado por la NADPH oxidasa (NOX). El H₂O₂ puede ser reducido a ión hidroxilo (HO[•]) por iones de hierro (Fe²⁺), o bien puede ser detoxificado a H₂O y O₂ por las enzimas catalasa (CAT) o GPX.

Es importante resaltar el papel del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) en la respuesta citoprotectora contra agentes oxidantes. Este factor de transcripción, cuando es liberado de su inhibidor (la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch, KEAP1) y translocado al núcleo, es capaz de unirse a secuencias de “elementos de respuesta antioxidante” (ARE) y activar la transcripción de genes que codifican enzimas implicadas en reacciones de detoxificación o de respuestas antioxidantes (Chartoumpakis y Kensler, 2013).

Por último, además de los sistemas antioxidantes clásicos, las sirtuinas son importantes sensores energéticos implicados en la regulación del metabolismo y la función mitocondrial

(Bause y Haigis, 2013). Cabe destacar la sirtuina 3 (SIRT3), una deacetilasa mitocondrial dependiente de NAD^+ capaz de unirse y deacetilar varias enzimas metabólicas y respiratorias que regulan importantes funciones mitocondriales (Onyango *et al.*, 2002). Se ha visto que SIRT3 no solo participa en la regulación de la producción de ERO en la cadena de transporte de electrones, sino que también interviene en la detoxificación de ERO a través de la activación de enzimas antioxidantes (Ahn *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2011; Sundaresan *et al.*, 2009). De hecho, varios trabajos han señalado que SIRT3 es capaz de proteger a las células del daño oxidativo y desempeña un papel en la regulación de la homeostasis de ERO (Qiu *et al.*, 2010; Someya *et al.*, 2010).

1.5.1.5. Estrés oxidativo en la DM2

El estrés oxidativo es considerado como uno de los principales responsables de la patogénesis y desarrollo de la DM2 y sus complicaciones asociadas. Numerosos estudios han señalado que los pacientes con DM2 presentan un aumento de la producción de ERO y de los niveles de marcadores de daño tisular causado por estrés oxidativo, que viene acompañado de un descenso en las defensas antioxidantes en comparación con sujetos sanos (Escribano-Lopez *et al.*, 2016; Hernandez-Mijares *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2001).

Un ambiente oxidativo puede desencadenar una alteración en la sensibilidad a la insulina y disfunción de las células β pancreáticas, lo que contribuye de forma importante al desarrollo de enfermedad diabética. Algunos de los mecanismos por los que el estrés oxidativo promueve resistencia a la insulina son: la activación de quinasas que fosforilan en residuos de serina/treonina a los IRS y alteran la señalización de la insulina; la alteración de la distribución intracelular de los componentes de la ruta de la insulina; el descenso de la expresión génica del transportador de glucosa GLUT4 que hace que disminuya la captación de glucosa; y, por último, la alteración de la actividad mitocondrial (Bloch-Damti y Bashan, 2005; Eriksson, 2007). Además, el alto flujo de nutrientes y el aumento consecuente en la liberación de ERO parecen estar implicados en la pérdida de la función de las células β del páncreas. Las células β son especialmente sensibles al estrés oxidativo ya que tienen una escasa capacidad antioxidante (Lenzen *et al.*, 1996; Miki *et al.*, 2018). El exceso de ERO está implicado en la disminución de la capacidad secretora de insulina y el aumento de la apoptosis que causan la disfunción de las células β (Drews *et al.*, 2010).

1.5.1.5.1. Hiperglucemia y estrés oxidativo

La hiperglucemia es considerada como uno de los principales factores responsables del estrés oxidativo en los pacientes diabéticos (Yaribeygi *et al.*, 2018b). Estudios clásicos demostraron que el aumento en las concentraciones de glucosa provocaban un aumento directamente proporcional en el grado de peroxidación lipídica (un marcador de estrés oxidativo) de eritrocitos humanos *in vitro* (Jain, 1989). Este resultado se confirmó al observar una correlación entre los niveles de HbA_{1c} y la peroxidación lipídica en eritrocitos de pacientes diabéticos (Jain *et al.*, 1989). En un tercer estudio realizado por el mismo grupo sobre un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en rata, observaron que la peroxidación lipídica de los eritrocitos podía prevenirse mediante el control de la glucemia con insulina (Jain *et al.*, 1990), reforzando la idea de que la hiperglucemia juega un papel importante en el aumento del estrés oxidativo. Los electrones del metabolismo aeróbico de la glucosa son almacenados principalmente en moléculas de NADH. Bajo condiciones de hiperglucemia, debido al aumento de la glucólisis, se produce más NADH y, por tanto, más oxidación de éste por el complejo I mitocondrial y más producción de ERO. El aumento en los niveles de ERO provoca la inhibición de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Hwang *et al.*, 2009), lo que compromete el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs, e induce una acumulación de gliceraldehído 3-fosfato. De manera que, con el fin de metabolizar los intermediarios glucolíticos que se acumulan tras la inhibición de la GAPDH, se activan cuatro rutas alternativas que desencadenan una liberación excesiva de ERO: la ruta del polialcohol, la ruta de la hexosamina, la activación de la ruta de la PKC y la formación de productos avanzados de glucosilación (AGEs) (Robertson, 2004; Yaribeygi *et al.*, 2018b). Bajo condiciones de normoglucemia, el metabolismo de glucosa a través de estas rutas es minoritario; sin embargo bajo condiciones de hiperglucemia cobran mayor importancia, dando lugar a un aumento del estrés oxidativo que puede finalmente llevar al desarrollo de complicaciones vasculares.

1.5.1.5.1.1. Ruta del polialcohol

Bajo condiciones de hiperglucemia se produce un aumento de la actividad de la enzima aldosa reductasa, que es capaz de reducir glucosa a sorbitol de una manera dependiente de NADPH. Como resultado descienden los niveles de NADPH, un cofactor utilizado por la glutatión reductasa para generar GSH a partir de GSSG, de forma que la producción de GSH disminuye y la capacidad antioxidante de la célula se ve comprometida (Brownlee, 2005).

1.5.1.5.1.2. Ruta de la hexosamina

Cuando la concentración de glucosa en la célula es alta, la ruta de la glucólisis se puede diversificar de modo que la fructosa 6-fosfato puede servir como sustrato a la enzima glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) para generar glucosamina 6-fosfato, que puede ser posteriormente convertida a uridina difosfato (UDP)-N-acetilglucosamina. Esta última molécula es sustrato de una enzima capaz de transferirla a residuos de serina/treonina de otras proteínas (como la eNOS) y factores de transcripción (como Sp1), modificándolos postranscripcionalmente y dando lugar a cambios en la expresión de algunos genes (como PAI-1). Se ha visto que el aumento del flujo de glucosa a través de la ruta de la hexosamina está implicado en la generación de ERO (Goldberg *et al.*, 2011; Rajapakse *et al.*, 2009) y en el desarrollo de complicaciones de la diabetes (McLarty *et al.*, 2013; Schleicher y Weigert, 2000).

1.5.1.5.1.3. Activación de la ruta de la PKC

Bajo condiciones de hiperglucemia aumenta la síntesis de novo de diacilglicerol, un activador de la PKC. Los efectos de la activación de la PKC son múltiples. Por ejemplo, la PKC induce la producción de ERO al activar la NOX (Xia *et al.*, 2008). La activación de la PKC resulta en una alteración del flujo sanguíneo donde se ve inhibida la vasodilatación, ya que la PKC inhibe la eNOS (Fleming y Busse, 2003); y aumentada la vasoconstricción, al activar la endotelina-1 (Park *et al.*, 2000). Además, la PKC induce la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), lo que produce cambios en la angiogénesis y en la permeabilidad de los vasos (Xu *et al.*, 2008). Para terminar, entre las funciones de la PKC se encuentra la de activar NF- κ B, promoviendo así la expresión de genes proinflamatorios (Saijo *et al.*, 2002). Por lo tanto, la activación de esta ruta no solo contribuye al aumento del estrés oxidativo, sino que también tiene importantes efectos sobre la vasculatura, constituyendo un mecanismo principal en el desarrollo de enfermedades vasculares.

1.5.1.5.1.4. Formación de productos avanzados de glucosilación (AGEs)

Un nivel elevado de glucosa puede inducir la formación de glioxal o de metilglioxal, dos intermediarios muy reactivos que pueden modificar proteínas mediante glucosilación de grupos amino para formar los AGEs (Degenhardt *et al.*, 1998). La modificación de las proteínas por AGEs altera la función de éstas; así mismo, la producción excesiva de AGEs puede producir daño a través de la unión a sus receptores (RAGE) en la superficie celular. Esta interacción promueve la activación de la NOX y por tanto el aumento de la producción intracelular de ERO (Wautier *et al.*, 2001), lo que desencadena finalmente la activación de NF- κ B que causa cambios patológicos en la expresión génica y la respuesta inflamatoria. Además de la producción endógena de AGEs,

éstos pueden ser adquiridos exógenamente a través de los alimentos (Uribarri *et al.*, 2005). El aumento del estrés oxidativo y la inducción de la respuesta inflamatoria promovida por AGEs y sus receptores contribuyen a la patogénesis de las complicaciones diabéticas. De hecho, recientemente se ha demostrado que la acumulación plasmática de AGEs está asociada con un aumento en la incidencia de enfermedad cardiovascular (Koska *et al.*, 2018).

1.5.1.5.2. Defensas antioxidantes en la DM2

Los pacientes con DM2 presentan una disminución de las defensas antioxidantes (Calabrese *et al.*, 2012; Hernandez-Mijares *et al.*, 2011; Hernandez-Mijares *et al.*, 2013) que, a menudo, se ve agravado por la presencia de enfermedades vasculares (Lutchmansingh *et al.*, 2018). Desde hace décadas, se han venido realizando estudios para determinar si es posible prevenir o retrasar la aparición de complicaciones vasculares mediante el uso de estrategias que disminuyan el estrés oxidativo. Kedziora-Kornatowska y colaboradores demostraron que el tratamiento de ratas diabéticas con vitaminas C y E no sólo disminuía la peroxidación lipídica y aumentaba la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-peroxidasa en el riñón de las ratas tratadas, sino que además promovía un descenso de la excreción de albúmina en la orina, una disminución del grosor de la membrana basal glomerular y reducía el peso de los riñones, indicando que el suplemento con estas vitaminas antioxidantes puede ser útil en la prevención de la nefropatía diabética (Kedziora-Kornatowska *et al.*, 2003). Además, en un modelo similar, la vitamina E mejoró la disfunción endotelial aumentando la contractilidad vascular de la aorta, probablemente mediante la reducción de la peroxidación lipídica (Cinar *et al.*, 2001). Como éstos, numerosos estudios en modelos experimentales han demostrado los beneficios del suplemento con antioxidantes sobre la vasculatura y el desarrollo de complicaciones vasculares, por lo que no es de extrañar que paralelamente se hayan realizado estudios clínicos para estudiar los posibles beneficios de la suplementación con antioxidantes sobre pacientes con DM2. Así, en un metaanálisis reciente en el que se analizaron 30 ensayos clínicos aleatorizados concluyeron que la suplementación con vitaminas antioxidantes, especialmente vitamina E, en pacientes con DM2 podría mejorar la capacidad antioxidante y el control glucémico, lo que podría llegar a convertirse en una estrategia para controlar las complicaciones de la DM2 (Balbi *et al.*, 2018). Sin embargo, éste es un tema que ha suscitado gran controversia, ya que otros trabajos no pudieron demostrar un beneficio significativo de la suplementación con vitaminas sobre el control glucémico en pacientes con DM2 (Xu *et al.*, 2014).

1.5.2. Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial consiste en una alteración del número, la densidad o la función de las mitocondrias de una célula o tejido, que lleva a una pérdida de eficiencia de la cadena de transporte de electrones y una disminución en la síntesis de ATP. Las causas del mal funcionamiento mitocondrial pueden ser atribuidas a factores genéticos (como mutaciones en alguno de los genes que codifican las proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa), o a factores ambientales que causan estrés oxidativo (Niyazov *et al.*, 2016). Dado que las mitocondrias son la principal fuente de ERO en la célula, se convierten por proximidad en uno de los orgánulos más vulnerables a la acumulación de daño oxidativo (Kowaltowski y Vercesi, 1999). Las ERO producidas en la mitocondria durante el proceso de fosforilación oxidativa pueden dañar el ADN mitocondrial (ADNmt), los lípidos de las membranas mitocondriales o las proteínas de la cadena respiratoria, comprometiendo así la función mitocondrial.

El ADNmt es particularmente susceptible al daño por ERO ya que, a diferencia del ADN nuclear, no está protegido por histonas (Croteau y Bohr, 1997). Dado que codifica proteínas esenciales para el proceso de fosforilación oxidativa, el daño en el ADNmt causa alteraciones en la cadena respiratoria desencadenando de nuevo una mayor liberación de ERO. Este círculo vicioso promueve una secuencia de eventos que puede finalizar con la inducción de apoptosis (Ozawa, 1997).

El exceso de ERO puede dañar la cardiolipina, un fosfolípido de la membrana mitocondrial interna, lo que aumenta el flujo de protones a través de la misma hacia la matriz mitocondrial y, como consecuencia, se produce la pérdida parcial del potencial de membrana. Además, la cardiolipina constituye un componente crucial en el mantenimiento de la estabilidad de las proteínas implicadas en la cadena de transporte de electrones, por lo que su oxidación compromete la función mitocondrial (Chicco y Sparagna, 2007).

El estrés oxidativo puede causar daño en las proteínas mitocondriales, lo que disminuye su afinidad por coenzimas o sustratos limitando así su función (Pieczenik y Neustadt, 2007). En este sentido, el complejo I mitocondrial es especialmente susceptible al daño oxidativo y, puesto que es uno de los principales sitios de generación de ERO en la mitocondria, la alteración de su función desencadena una mayor liberación de ERO, entrando de nuevo en un círculo vicioso y acrecentando la disfunción mitocondrial (Musatov y Robinson, 2012). Particularmente, el deterioro del complejo I es de gran relevancia para la función mitocondrial debido a que, en

términos relativos, la membrana mitocondrial interna contiene menor cantidad de complejo I que del resto de complejos de la cadena respiratoria (Schagger y Pfeiffer, 2001).

Por lo tanto, la disfunción mitocondrial se caracteriza por una inhibición en el consumo de O₂, un descenso en la producción de ATP, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, alteraciones en el almacenamiento intracelular de calcio y una producción excesiva de ERO, sin olvidarnos de una reducción en la biogénesis mitocondrial y en el número y tamaño de las mitocondrias. Como consecuencia, la disfunción mitocondrial puede desencadenar cascadas de señalización que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis, y puede provocar daños en órganos y tejidos promoviendo el desarrollo de enfermedades entre las que se incluyen el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y obesidad (Victor *et al.*, 2011).

La disfunción mitocondrial se ha asociado desde hace tiempo con la resistencia a la insulina, de hecho se ha observado en tejidos como el muscular, adiposo y hepático tanto en humanos como en roedores con obesidad, síndrome metabólico y DM2 (Patti y Corvera, 2010). Existen múltiples maneras por las que la disfunción mitocondrial contribuye a la resistencia a la insulina. Por ejemplo, la disfunción mitocondrial por un lado aumenta la liberación de ERO y por otro lado, debido al descenso en la oxidación de ácidos grasos, provoca un aumento en los niveles de intermediarios lipídicos (diacilglicerol y acetil-CoA). Tanto el exceso de ERO como de intermediarios lipídicos inducen la activación de serina/treonina quinasas sensibles al estrés, que fosforilan a las proteínas IRS, inhibiendo la ruta de señalización de la insulina y promoviendo la resistencia a esta hormona (Rains y Jain, 2011).

1.5.2.1. Variaciones en el ADNmt y DM2

La disfunción mitocondrial puede ser causada por factores genéticos o ambientales, siendo todos ellos relevantes en la patogénesis de la DM2. Las modificaciones en el ADNmt, bien sean cualitativas (cambios en la secuencia) o cuantitativas (cambios en el número de copias), se han asociado con el riesgo de DM2. La cantidad de ADNmt en sangre periférica es menor en pacientes con DM2 que en controles sanos y esta reducción se puede observar incluso antes del desarrollo de la diabetes (Lee *et al.*, 1998). Además, en los descendientes no diabéticos de pacientes con DM2, el descenso en el contenido de ADNmt se asocia con una disminución en la sensibilidad a la insulina (Song *et al.*, 2001). Sin embargo, la publicación de estudios posteriores con resultados contradictorios ha abierto un debate donde se especula si la reducción en el contenido en ADNmt es causa o consecuencia de la alteración del metabolismo de la glucosa (Reiling *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2007). En cuanto a las modificaciones cualitativas, más de 250

mutaciones puntuales y deleciones en el ADNmt se han relacionado con enfermedades humanas, entre las que se encuentran algunos casos de diabetes y otras enfermedades metabólicas. Por ejemplo, se ha visto que una mutación en el nucleótido 3243 del ADNmt es responsable de una forma rara de diabetes heredada por vía materna que se asocia frecuentemente con sordera (Reardon *et al.*, 1992; van den Ouweland *et al.*, 1992). Esta mutación afecta al gen que codifica para el ARN de transferencia (ARNt) de la leucina, de manera que reduce la unión de este aminoácido a su ARNt, afectando así a la síntesis de proteínas mitocondriales necesarias para la fosforilación oxidativa y a la secreción de insulina estimulada por glucosa (Suzuki *et al.*, 1997).

1.5.2.1.1. Haplogrupos mitocondriales

Durante la evolución se han ido acumulando de manera secuencial mutaciones puntuales o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el ADNmt que permiten dividir a la población en un número discreto de grupos conocidos como haplogrupos o haplotipos mitocondriales. Los haplogrupos mitocondriales son variantes genéticas específicas de regiones geográficas que se cree que podrían haberse perpetuado por selección natural ante climas fríos o periodos de hambruna (Mishmar *et al.*, 2003). Los miembros del mismo haplogrupo mitocondrial comparten un ancestro materno común, por lo que son un reflejo de la evolución de las poblaciones humanas. Se ha sugerido que determinados haplogrupos mitocondriales, que en su momento pudieron suponer una ventaja en la adaptación a climas fríos, podrían haber resultado hoy en día en cambios en el metabolismo energético y alteraciones en la producción de ERO que afectan a la longevidad y predisponen frente a enfermedades metabólicas (Ruiz-Pesini *et al.*, 2004). En este sentido, varios trabajos han propuesto la existencia de una asociación entre determinados haplogrupos mitocondriales y la susceptibilidad a desarrollar DM2. Por ejemplo, en el estudio de Crispim y colaboradores analizaron un grupo de controles y pacientes con DM2 del sur de Brasil y encontraron una asociación del haplogrupo JT con un aumento en el riesgo de resistencia a la insulina y DM2 (Crispim *et al.*, 2006). Otro estudio realizado en una población china mostró una asociación entre el haplogrupo B4 y el riesgo de diabetes (Liou *et al.*, 2012). Además según dos estudios realizados en poblaciones asiáticas el haplogrupo N9a parece conferir un papel protector frente a la DM2 y el síndrome metabólico (Fuku *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007). Sin embargo, éste es de nuevo un tema que ha suscitado gran controversia, debido a la publicación de trabajos donde no se encontraron asociaciones concluyentes entre DM2 y variantes mitocondriales (Achilli *et al.*, 2011; Chinnery *et al.*, 2007; Mohlke *et al.*, 2005; Saxena *et al.*, 2006). Tal es el caso del estudio de Saxena y colaboradores en el que se analizaron un total de 3.304 pacientes diabéticos y sus correspondientes 3.304 controles procedentes de

Europa y Estados Unidos. Tras evaluar en la muestra las variantes de ADNmt más comunes (de frecuencia >1%) en Europa, no encontraron asociaciones significativas entre las variantes estudiadas y las características metabólicas de la población (Saxena *et al.*, 2006).

En un trabajo publicado en el año 2011, aunque Achilli y colaboradores no encontraron una relación entre los haplogrupos mitocondriales y la DM2, sí que observaron que los pacientes pertenecientes a determinados haplogrupos presentaban un mayor riesgo de desarrollar complicaciones vasculares asociadas a la DM2. De hecho, el haplogrupo H se asoció significativamente con retinopatía, el H3 con neuropatía, el U3 con nefropatía, y el V con fallo renal; indicando que ciertos haplogrupos mitocondriales podrían modular las complicaciones de la diabetes más que la DM2 en sí misma (Achilli *et al.*, 2011). Por lo tanto, sería conveniente seguir realizando estudios que nos permitan esclarecer las controversias existentes y arrojen luz sobre el posible papel que pueden desempeñar los distintos haplogrupos mitocondriales en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la DM2 y de sus complicaciones asociadas.

1.5.3. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias no son orgánulos estáticos y aislados, sino que se encuentran interconectadas entre sí y forman unas redes dinámicas que sufren continuamente ciclos de fusión y fisión. El comportamiento dinámico de las mitocondrias no solo determina su morfología y distribución intracelular, sino que además permite a la célula adaptarse a las condiciones fisiológicas y las demandas energéticas de cada momento. Por ejemplo, en células con un metabolismo muy activo, como las células musculares, las mitocondrias se fusionan y forman largas redes que permiten conectar las zonas periféricas ricas en O₂ con el interior de la fibra muscular pobre en O₂, y transmitir el potencial de membrana a lo largo de los filamentos mitocondriales contribuyendo a la disipación de energía y permitiendo la producción de ATP en distintas localizaciones de la célula (Skulachev, 2001).

Las proteínas implicadas en los procesos de fusión y fisión son GTPasas relacionadas con la familia de las dinaminas (Figura 6). Las mitofusinas (MFN) 1 y 2 son las encargadas de la fusión de la membrana mitocondrial externa, por la interacción homo- y/o heterotípica entre mitofusinas de mitocondrias adyacentes (Detmer y Chan, 2007a). MFN2 además se localiza en la membrana del retículo endoplasmático y está implicada en la interacción de éste con la mitocondria, que es esencial para la señalización por calcio (de Brito y Scorrano, 2008). Tras la fusión de la membrana mitocondrial externa, tiene lugar la fusión de la membrana interna por acción de la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1), que participa también en el remodelado de

las crestas mitocondriales (Frezza *et al.*, 2006). Por otro lado, la fisión comienza cuando varias unidades de la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1) son reclutadas hacia los sitios de fraccionamiento en la membrana mitocondrial externa, donde se ensamblan y forman una estructura con forma de anillo que constriñe las membranas mitocondriales de forma dependiente de GTP dando lugar a la separación de las mitocondrias (Elgass *et al.*, 2013). En el reclutamiento de DRP1 hacia la membrana mitocondrial externa participan varias proteínas ancladas a la misma como la proteína de fisión 1 (FIS1), el factor de fisión mitocondrial (MFF) y las proteínas de dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa (MiD49 y MiD51) (Loston *et al.*, 2013).

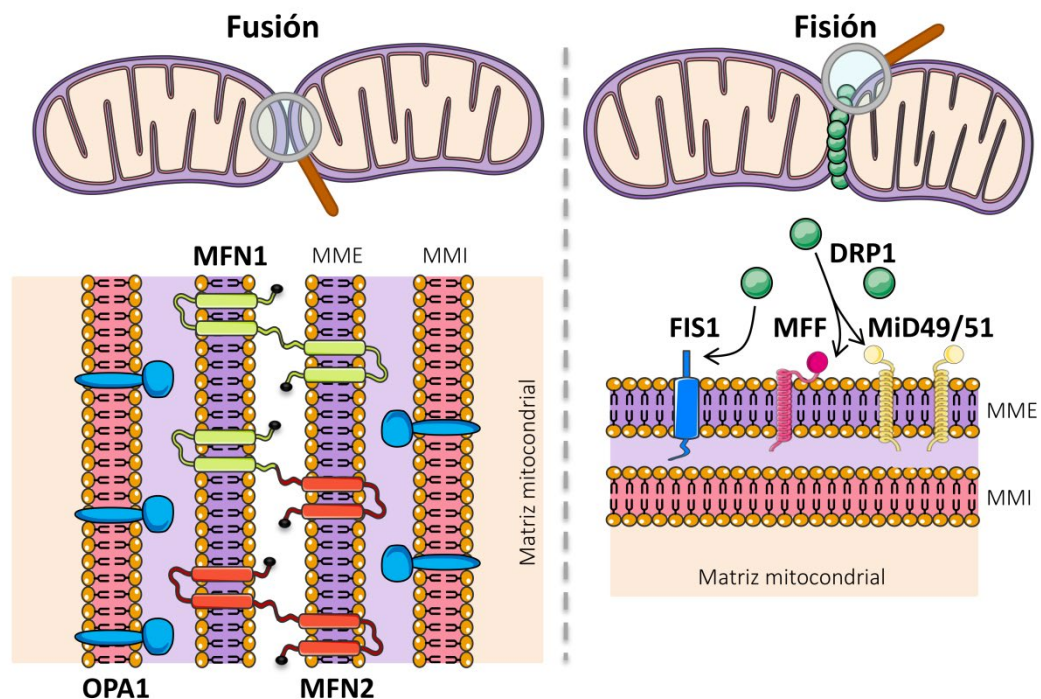


Figura 6. Regulación de la dinámica mitocondrial. La fusión de la membrana mitocondrial externa (MME) está mediada por interacciones homo- y/o heterotípicas entre mitofusina (MFN) 1 y 2, mientras que la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) se encarga de la fusión de la membrana interna (MMI). El proceso de fisión ocurre cuando la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1), habitualmente localizada en el citosol, es reclutada hacia la membrana mitocondrial externa por sus receptores: la proteína de fisión 1 (FIS1), el factor de fisión mitocondrial (MFF), y las proteínas de la dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa (MiD49/51).

Los procesos de fusión y fisión sirven como mecanismos de control de calidad en la homeostasis y la función mitocondrial. Así la fusión, además de permitir la transmisión de potencial de membrana desde zonas con alta biodisponibilidad de O_2 a zonas pobres en O_2 para modular la producción de ATP, favorece también el intercambio de material (ADNmt, metabolitos, sustratos, lípidos, etc.) entre mitocondrias, permitiendo a las mitocondrias intactas

complementar a las dañadas. El proceso de fisión, por otra parte, es fundamental en la herencia y reparto de mitocondrias durante la división celular, favorece la segregación y eliminación de los componentes mitocondriales dañados por mitofagia, y participa en el proceso de apoptosis al regular la liberación al citosol de componentes del espacio intermembrana (Detmer y Chan, 2007b).

La dinámica mitocondrial, por lo tanto, es un proceso complejo que depende de las necesidades de cada momento y requiere un balance equilibrado entre la fusión y la fisión. De hecho, la fragmentación de las redes mitocondriales, ya sea por falta de fusión o por exceso de fisión, suele estar asociada con defectos en la producción de energía celular y aumento de la apoptosis (Detmer y Chan, 2007b), por lo que cualquier estado que altere el equilibrio fusión/fisión puede desembocar en disfunción mitocondrial, liberación excesiva de ERO y cambios en el metabolismo, que finalmente pueden contribuir a la patogénesis de la DM2.

1.5.3.1. Dinámica mitocondrial en la DM2

Estudios de la morfología mitocondrial indican que en la DM2 existe un aumento en la fragmentación de las mitocondrias que está relacionado con un aumento en los niveles de proteínas de fisión y un descenso en las de fusión. En células de músculo esquelético de pacientes con DM2 se ha observado una reducción en el tamaño de las mitocondrias que se asocia con una menor actividad del complejo I mitocondrial y, por tanto, una alteración en la capacidad bioenergética (Kelley *et al.*, 2002). Los cambios en la morfología mitocondrial de células musculares diabéticas humanas están relacionados con un descenso en la expresión de *MFN2* (Bach *et al.*, 2005). Esta proteína de fusión, además de participar en el mantenimiento de la red mitocondrial, está implicada en la regulación del metabolismo ya que estimula la oxidación de sustratos, la respiración mitocondrial y la expresión de proteínas de la cadena respiratoria. Por todo ello, se ha propuesto que las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial podrían estar implicadas en la disfunción mitocondrial de la DM2 y en el desarrollo de resistencia a la insulina (Zorzano *et al.*, 2009).

La dinámica mitocondrial juega un papel importante en la secreción de insulina por parte de las células β (Lo *et al.*, 2015; Reinhardt *et al.*, 2016). De hecho, Schultz y colaboradores confirmaron que la proteína de fisión FIS1 actúa como un regulador en estas células y demostraron que los niveles de expresión de FIS1 están relacionados con la secreción de insulina estimulada por glucosa (Schultz *et al.*, 2016). Además, se ha señalado un posible papel de la fisión mitocondrial en la apoptosis de las células β . Molina y colaboradores demostraron que la exposición a

elevados niveles de glucosa y ácidos grasos promovía la fragmentación de las mitocondrias en células β -pancreáticas. Cuando la fisión mitocondrial era inhibida, la morfología y la dinámica mitocondrial se conservaba y se prevenía la apoptosis de las células β (Molina *et al.*, 2009).

Cabe destacar la relación causal que se ha encontrado entre la alteración de la dinámica mitocondrial y la producción de ERO bajo condiciones de hiperglucemia (Yu *et al.*, 2006). En este trabajo, Yu y su equipo observaron que la exposición a altos niveles de glucosa promovía rápidamente una fragmentación de las mitocondrias, y que esta fragmentación era necesaria para el incremento en la producción de ERO inducido por la hiperglucemia (Yu *et al.*, 2006). Sin embargo, los desequilibrios en la homeostasis de la glucosa no siempre son una causa de la alteración de la dinámica mitocondrial, sino que pueden ser una consecuencia de ella. Así sugiere, por ejemplo, el trabajo de Sebastián y colaboradores, en el que la inactivación génica de *Mfn2* en el hígado de ratones provocó intolerancia a la glucosa, un aumento de la gluconeogénesis hepática y una alteración de la señalización por insulina (Sebastian *et al.*, 2012).

Por último, es importante remarcar que la fisión mitocondrial se ha asociado con mecanismos que contribuyen al desarrollo de aterosclerosis en la DM2, como la disfunción endotelial. Un importante estudio publicado en 2011 señaló que tanto las células endoteliales provenientes de pacientes con DM2, como células endoteliales en cultivo con altas concentraciones de glucosa, muestran un aumento en la fragmentación mitocondrial, en los niveles de FIS1 y una alteración de la función endotelial. Sin embargo, si bloqueaban la expresión de FIS1, la función endotelial y las redes mitocondriales se mantenían intactas. Por lo que los autores de este trabajo sugieren la inhibición farmacológica de la fisión mitocondrial como un posible mecanismo protector contra el desarrollo de complicaciones vasculares de la DM2 (Shenouda *et al.*, 2011).

El conocimiento de los mecanismos que llevan a una alteración en la dinámica mitocondrial de los pacientes con DM2 es fundamental para entender mejor el papel que juega la pérdida de redes mitocondriales en el desarrollo de la enfermedad y poder diseñar estrategias que prevengan o modulen los daños causados sobre los diferentes tejidos.

1.5.4. Activación de la respuesta a proteínas mal plegadas

El retículo endoplasmático (RE) constituye un sistema de membranas tubulares interconectadas entre sí que se extiende a lo largo del citoplasma de la célula. Este orgánulo controla la síntesis, modificación, plegamiento y exportación de proteínas, participa en la biosíntesis de esteroides, colesterol, y otros lípidos, es un importante almacén de calcio, y sirve como plataforma de

señalización entre el núcleo y el citosol (Lam y Galione, 2013). Por lo tanto, el mantenimiento de su homeostasis es esencial para preservar la función y viabilidad celular. La eficiencia de las funciones del RE depende de una alta concentración de calcio, un ambiente oxidativo y chaperonas moleculares. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias –como cambios en el estado redox del RE, descenso en los niveles de calcio, y/o acumulación de proteínas mal plegadas– se produce una alteración en la homeostasis del RE conocida como estrés de RE. Esta situación es reconocida por proteínas localizadas en la membrana del RE que activan la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés “unfolded protein response”) con el fin de restablecer el buen funcionamiento del RE (Schroder y Kaufman, 2005). La UPR actúa de diferentes maneras: (i) inhibe la síntesis de proteínas para disminuir la sobrecarga del RE; (ii) aumenta el aclaramiento de proteínas mal plegadas al aumentar la expresión de los componentes del sistema de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD); (iii) promueve la expansión del RE y la expresión de chaperonas para así incrementar la capacidad de plegamiento de proteínas. Si esta respuesta adaptativa no es capaz de resolver el estrés de RE, la UPR finalmente pondrá en marcha cascadas pro-apoptóticas con el fin de eliminar la célula dañada del organismo (Kim *et al.*, 2008).

La UPR implica tres rutas de señalización que son iniciadas por tres proteínas transmembrana: la quinasa del RE tipo proteína quinasa R (PERK), la proteína 1 que requiere inositol (IRE1), y el factor de transcripción activador 6 (ATF6) (Figura 7). Bajo condiciones normales, estas tres proteínas se encuentran inactivas unidas a la proteína de 78KDa regulada por glucosa (GRP78); sin embargo, cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del RE, GRP78 se disocia de las proteínas transmembrana para ejercer su acción plegadora de chaperona molecular, dejando libres para ejercer su acción a las tres proteínas encargadas de la UPR (Malhotra y Kaufman, 2007). El reconocimiento de proteínas mal plegadas por la serina/treonina quinasa PERK hace que se fosforile e inactive el factor iniciador de la traducción eucariota 2α (eIF2 α), de forma que se inhibe la traducción proteica para prevenir la acumulación de más proteínas en el RE. Además, PERK promueve la activación del factor de transcripción activador 4 (ATF4), que aumenta el nivel de chaperonas como GRP78 y ayuda a restaurar la homeostasis redox al promover la expresión de genes antioxidantes. La proteína IRE1, con su acción endorribonucleasa, elimina un intrón del ARNm de la proteína 1 de unión a X-box (*XBP1*) para generar su forma transcripcionalmente activa (*sXBP1*, “spliced *XBP1*”). El factor de transcripción *sXBP1* está implicado en la expresión de genes relacionados con la UPR (como chaperonas) y con el sistema ERAD. Por último, ATF6 tras la disociación de GRP78 deja expuesta su señal de localización, de manera que es translocado al aparato de Golgi donde se activa por proteólisis.

Al igual que en la ruta IRE1/XBP1, ATF6 activado promueve la expresión en el núcleo de chaperonas del RE y componentes del sistema ERAD (Malhotra y Kaufman, 2007).

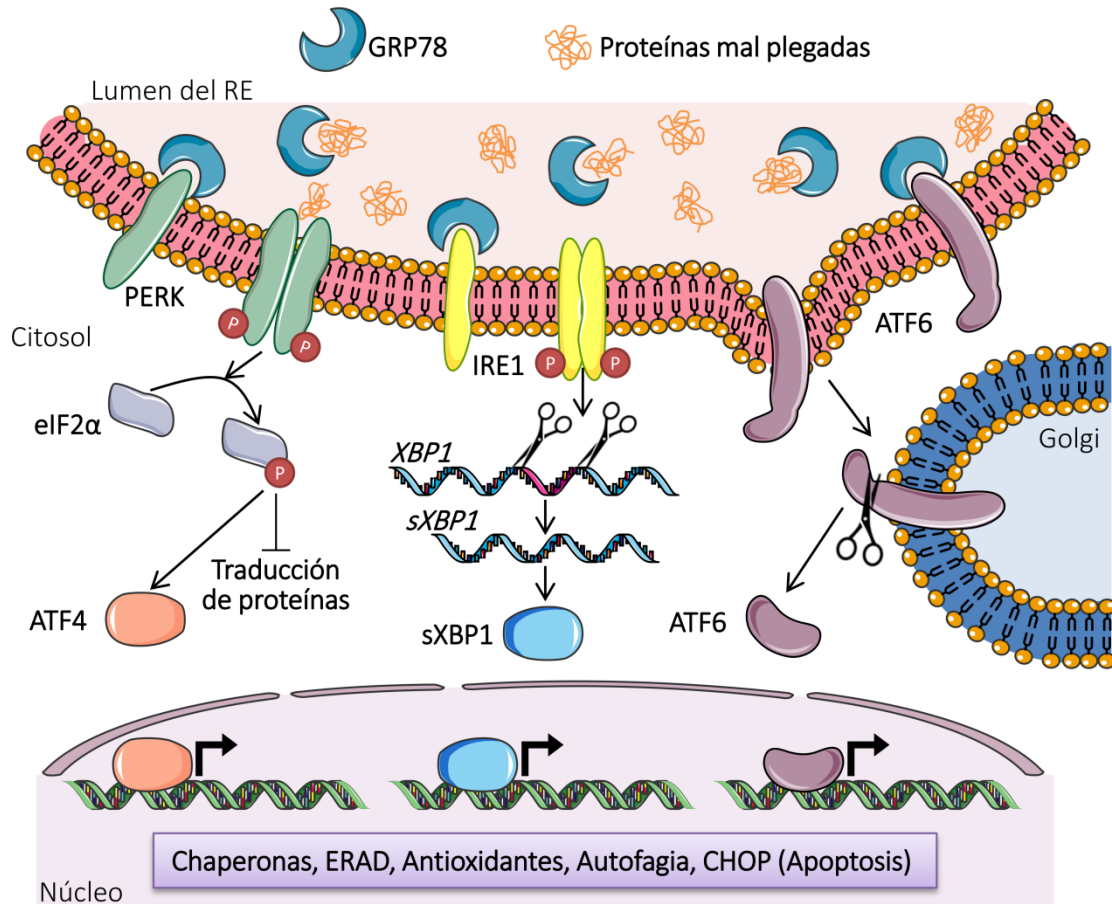


Figura 7. Las tres vías de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Cuando hay una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (RE), la proteína de 78KDa regulada por glucosa (GRP78) se une a ellas para ejercer su acción como chaperona, dejando libres a las tres proteínas de membrana a las que regula negativamente y que inician la UPR. La quinasa del RE tipo proteína quinasa R (PERK) fosforila al factor iniciador de la traducción eucariota 2α (eIF2α), de manera que se promueve, por un lado, la inhibición de la traducción proteica como mecanismo para aliviar la carga de plegamiento del RE y, por otro, la expresión y activación del factor de transcripción activador 4 (ATF4). La segunda de las vías es iniciada por la proteína 1 que requiere inositol (IRE1), que es capaz de procesar el ARNm de la proteína 1 de unión a X-box (*XBP1*) dando origen a la forma transcripcionalmente activa de *XBP1* (*sXBP1*). Por último, el factor de transcripción activador 6 (ATF6) es translocado al aparato de Golgi para su activación proteolítica. ATF4, *sXBP1* y ATF6 son factores de transcripción que entran en el núcleo para promover la expresión de genes relacionados con el plegamiento proteico, el sistema de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD), respuestas antioxidantes, el proceso de autofagia y la apoptosis celular. CHOP, proteína homóloga de C/EBP.

Bajo determinadas circunstancias, el estrés de RE es capaz de inducir autofagia con el fin de ayudar a eliminar el exceso de proteínas mal plegadas y contrarrestar la expansión del RE, promoviendo de esta manera la supervivencia celular (Hoyer-Hansen y Jaattela, 2007). Sin embargo, cuando la activación de la UPR es incapaz de restaurar la homeostasis del RE, la respuesta adaptativa cambia hacia una respuesta pro-apoptótica. Los tres factores de transcripción implicados en las tres vías de la UPR (ATF4, sXBP1 y ATF6) son capaces de promover la expresión del gen que codifica para la proteína homóloga de C/EBP (CHOP), implicada en la apoptosis inducida por estrés de RE (Kim *et al.*, 2008).

1.5.4.1. Estrés de RE en la DM2

El estrés de RE puede ser promovido por estímulos inflamatorios, estrés oxidativo, o alteraciones metabólicas. Como hemos visto, bajo condiciones de estrés de RE, se activa la UPR para intentar restablecer la homeostasis celular; sin embargo, si la situación de estrés de RE se mantiene de manera crónica, puede participar en el desarrollo de enfermedades como obesidad, aterosclerosis, DM2, etc., (Lee y Ozcan, 2014). Ya en 2004, Ozcan y colaboradores observaron un aumento del estrés de RE en hígado y tejido adiposo de ratones obesos. En dicho estudio, observaron que el aumento del estrés de RE promueve la activación de la quinasa JNK a través de la vía de IRE1, lo que causa la fosforilación de IRS-1 y la consiguiente inhibición de la ruta de señalización de la insulina. De esta manera, concluyeron que el estrés de RE constituye un nexo de unión entre la obesidad, la inhibición de la acción de la insulina y el desarrollo de DM2 (Ozcan *et al.*, 2004). Posteriormente se vio que en tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos existía también este aumento de la ruta de señalización de IRE1/XBP1 y de los niveles de expresión de JNK (Boden *et al.*, 2008). En esta línea, nuestro grupo de investigación ha constatado que los niveles de expresión de marcadores de estrés de RE estaban aumentados en leucocitos de sangre periférica en una población obesa con diabetes respecto a una población obesa sin patología (Bañuls *et al.*, 2017). Curiosamente, la expresión de marcadores de estrés de RE disminuyó en tejido adiposo, hígado y leucocitos de sangre periférica tras la pérdida de peso en pacientes obesos (Gregor *et al.*, 2009; Lopez-Domenech *et al.*, 2018a), y en ratas obesas sometidas a ejercicio físico (da Luz *et al.*, 2011), cambios que se asociaron a una mejora de la resistencia a la insulina. Continuando con el papel que juega el estrés de RE en el desarrollo de resistencia a la insulina, otro estudio demostró que el estrés de RE activa la proteína PTP1B (un regulador negativo de la ruta de la insulina localizado en la membrana del RE), y que ésta es requerida para la activación de las vías de la UPR que median la resistencia a la insulina en músculo esquelético (Panzhinskiy *et al.*, 2013). En el hígado, el estrés de RE

contribuye a la resistencia a la insulina mediante la activación de factores de transcripción que regulan la gluconeogénesis y la lipogénesis (Chan *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2010).

Además de su implicación en la resistencia a la insulina, el estrés de RE juega un papel crucial en la disfunción de las células β pancreáticas que termina con su destrucción en la DM2 (Volchuk y Ron, 2010). Las células β son particularmente susceptibles de sufrir estrés de RE debido a su acción secretagoga. El RE es el lugar donde se sintetiza y pliega la proinsulina, que posteriormente se exporta al aparato de Golgi donde es procesada por proteasas para formar la insulina madura. Durante los estados de resistencia a la insulina que tienen lugar antes del desarrollo de la DM2 aumenta la síntesis de proinsulina como mecanismo compensatorio, de tal forma que la capacidad de plegamiento del RE puede verse sobrepasada y desencadenar estrés de RE. La acumulación de proteínas mal plegadas (como la proinsulina) en el RE puede promover la muerte celular de las células β a través de la activación prolongada de la vía PERK/eIF2 α que lleva a la producción de factores pro-apoptóticos como CHOP (Han *et al.*, 2013; Volchuk y Ron, 2010). Además de éste, otros mecanismos como la glucolipototoxicidad, la inflamación y la acumulación de amilina son capaces de promover el estrés de RE que lleva a la disfunción de las células β (Salvado *et al.*, 2015).

Por último, cabe destacar que tanto la inflamación como el estrés oxidativo están relacionados con el estrés de RE en la DM2. Las tres rutas de la UPR están ligadas a la señalización inflamatoria a través de la activación de NF- κ B (Hotamisligil, 2010). Además, cuando IRE1 está activado es capaz de reclutar el factor 2 asociado al receptor de TNF- α (TRAF2) y así activar JNK (Urano *et al.*, 2000). Una vez activados, tanto NF- κ B como JNK, continúan con la cascada inflamatoria. Por otro lado, IRE1 y PERK a través de un aumento en la expresión de TXNIP (proteína que interactúa con la tiorredoxina) son capaces de activar el inflammasoma NLRP3, y así incrementar la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β (Osowski *et al.*, 2012). En cuanto al estrés oxidativo, la activación de la UPR puede resultar en una acumulación excesiva de ERO. Las chaperonas encargadas del correcto plegamiento de las proteínas llevan a cabo reacciones redox para formar los puentes disulfuro. En estas reacciones se transfieren electrones desde los grupos tiol de las proteínas que se están plegando al O $_2$ generando ERO como subproducto. Por tanto, durante la UPR el aumento de la actividad de estas proteínas tiene como resultado un incremento en la producción de ERO (Haynes *et al.*, 2004). No obstante, la UPR es capaz de contrarrestar este aumento del estrés oxidativo al activar Nrf2 por acción de la quinasa PERK, promoviendo así un mecanismo de respuesta antioxidante (Cullinan *et al.*, 2003). Es importante tener en cuenta que las relaciones estrés de RE/inflamación y estrés

de RE/estrés oxidativo no son unidireccionales, sino que tanto el aumento de ERO como algunas señales inflamatorias son capaces de acelerar la disfunción del RE y promover estrés de RE (Hotamisligil, 2010).

El estudio de los mecanismos que promueven el estrés de RE en la DM2 es fundamental para el diseño de herramientas terapéuticas que alivien o prevengan las consecuencias de éste sobre los tejidos de los pacientes diabéticos.

1.5.5. Autofagia

La autofagia es un mecanismo celular por el que se promueve la degradación proteolítica de componentes citosólicos. Por medio de este proceso se facilita la eliminación y reciclaje de orgánulos dañados, proteínas mal plegadas e incluso patógenos, por lo que es fundamental en el mantenimiento de la función celular normal. La autofagia es inducida bajo situaciones de privación de nutrientes como un mecanismo adaptativo de respuesta celular que asegura el aporte de nutrientes para la síntesis de ATP en estas condiciones, promoviendo la supervivencia de la célula hasta que los nutrientes estén disponibles de nuevo. Además de jugar un papel importante en el manejo del estrés oxidativo o la degradación de proteínas mal plegadas, la autofagia participa en la inmunidad innata y adaptativa, contribuye a la longevidad y, bajo determinadas circunstancias, puede inducir muerte celular programada de tipo II (también conocida como muerte celular por autofagia). Por lo tanto, la autofagia es un proceso crucial para la supervivencia y función celular (especialmente en ambientes estresantes), y su alteración contribuye al desarrollo de una gran variedad de enfermedades, como desórdenes musculares, DM2, obesidad, enfermedades neurodegenerativas o cáncer (Eskelinen y Saftig, 2009; Sarparanta *et al.*, 2017).

El proceso de autofagia (Figura 8) comienza con la formación y prolongación de una membrana de aislamiento, conocida como fagóforo, que va rodeando una porción del citoplasma hasta completar la formación de una vesícula de doble membrana, que recibe el nombre de autofagosoma y que contiene en su interior los elementos y orgánulos a degradar. Es entonces cuando el autofagosoma madura y se fusiona con lisosomas, aportando de esta manera las enzimas hidrolíticas necesarias para digerir el material capturado y la membrana interna del autolisosoma. Finalmente, los productos generados tras la degradación son transportados de vuelta al citosol para ser reutilizados por la célula (Levine y Kroemer, 2008). La maquinaria encargada de orquestar estos procesos secuenciales ha sido ampliamente estudiada en levaduras y consiste en más de 30 proteínas relacionadas con la autofagia (ATG). Un miembro

importante de esta familia es la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3, cuyo homólogo en levaduras es ATG8). La forma citosólica de LC3 (LC3-I) puede unirse a fosfatidiletanolamina y generar la forma conjugada de LC3 (LC3-II) que es reclutada hacia la membrana del autofagosoma. La conjugación de LC3 sólo ocurre tras la inducción de la autofagia y LC3-II permanece asociado al autofagosoma hasta su maduración y conversión en autolisosoma, por lo que es ampliamente utilizado como un marcador de autofagia (Lee y Lee, 2016). Otras dos proteínas importantes en el proceso de autofagia son ATG7 y Beclina 1. ATG7 participa en la conjugación de LC3-I con fosfatidiletanolamina (Ichimura *et al.*, 2000), mientras que Beclina 1 (ATG6 en levaduras) forma parte de varios complejos proteicos y participa en el reclutamiento de proteínas para la formación y maduración del autofagosoma (Figura 8) (Matsunaga *et al.*, 2009).

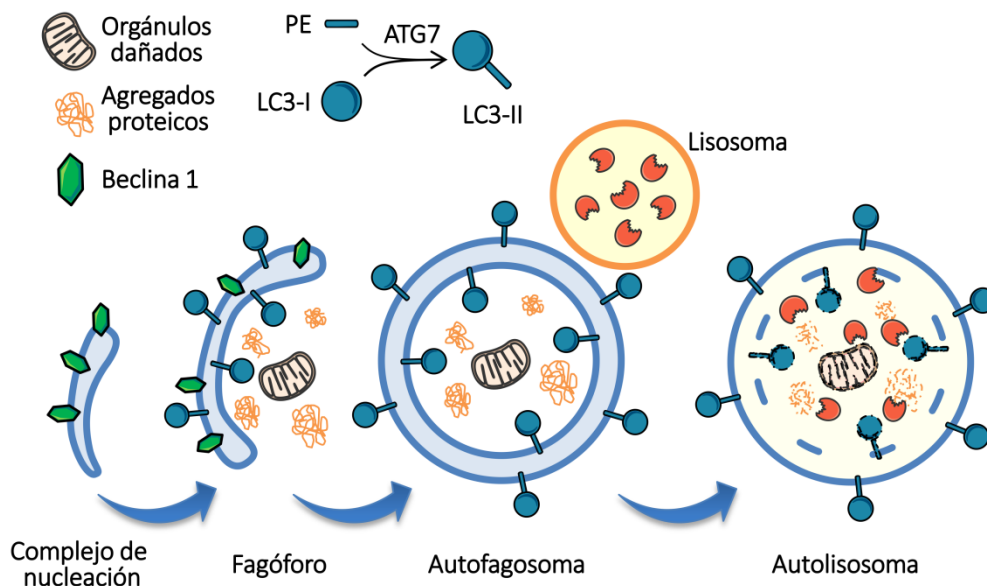


Figura 8. Autofagia. El proceso de autofagia comienza con la formación de un complejo de nucleación que se va prolongando para dar lugar al fagóforo. La formación del fagóforo de doble membrana requiere la conjugación de la forma citosólica de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3-I) con fosfatidiletanolamina (PE), que da origen a una forma conjugada de LC3 (LC3-II) capaz de unirse a la membrana del fagóforo. El fagóforo rodea material a degradar hasta que se cierra para formar el autofagosoma. La fusión de éste con un lisosoma produce el autolisosoma, donde el contenido es degradado por las hidroxilasas lisosomales. ATG7, proteína 7 relacionada con la autofagia.

La regulación de la ruta de la autofagia está controlada por la quinasa mTOR (proteína diana de la rapamicina en mamíferos), que en condiciones de abundancia de nutrientes es capaz de inhibir la autofagia. Por el contrario, cuando se dan situaciones de escasez de nutrientes la acción de mTOR es inhibida, y se induce la autofagia. Además de la disponibilidad de nutrientes,

la autofagia también se controla por la acción de la insulina. Esta hormona inhibe la autofagia de dos maneras: (i) mediante la activación de mTOR, y (ii) mediante la activación de Akt, que inhibe el factor de transcripción encargado de la expresión de los genes *ATG* (Jung *et al.*, 2010).

Un estricto control de los mecanismos de autofagia parece ser clave a la hora de mantener la homeostasis y la función de las células β . Como se indicó anteriormente, debido a la función secretora de las células β , éstas son propensas a la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas, especialmente en condiciones de hiperglucemia y estrés oxidativo. En este sentido, se ha visto que la autofagia juega un papel fundamental en la eliminación de tales agregados proteicos, demostrando que puede actuar como un mecanismo de defensa bajo condiciones diabéticas (Kaniuk *et al.*, 2007). Además, a través de la autofagia se eliminan también orgánulos dañados o disfuncionales. La eliminación y reciclaje de mitocondrias por autofagia se conoce como mitofagia y, dado el daño que puede causar la disfunción y el exceso de ERO mitocondriales, este mecanismo celular previene la acumulación de mitocondrias dañadas y asegura un mantenimiento óptimo de la función mitocondrial (Twig *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el papel de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis celular, unido a su regulación por la disponibilidad de nutrientes y hormonas, convierten a este proceso en un mecanismo de gran importancia en la fisiopatología de enfermedades metabólicas como la DM2.

1.5.5.1. Autofagia en la DM2

Una de las aproximaciones para el estudio del papel de la autofagia sobre la disfunción de las células β se ha llevado a cabo mediante la generación de ratones cuyas células β son knockout para el gen *Atg7*. A nivel morfológico, la pérdida de autofagia en las células β promueve la acumulación de agregados proteicos, mitocondrias con morfología aberrante, distensión del RE y cambios vacuolares. Además, estos ratones presentan una disminución en la secreción de insulina, una alteración en la tolerancia a la glucosa, hiperglucemia, y una reducción en la masa de células β (Ebato *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008). En un estudio llevado a cabo por Quan y colaboradores, observaron que ratones con obesidad inducida genéticamente presentaban hiperglucemia (pero no diabetes) y una expresión aumentada de los genes relacionados con la UPR y la autofagia. Si cruzaban estos ratones obesos con los knockout de *Atg7* en células β , la descendencia resultante desarrollaba diabetes y presentaba una pérdida significativa de células β y una acumulación excesiva de ERO. Además, el aumento de la expresión de los genes de la UPR que se había observado en condiciones de obesidad, desaparece en las células β con

la autofagia bloqueada. Por lo tanto, los autores de este trabajo argumentaron que cuando se suprime la autofagia, las células β son incapaces de adaptarse a un ambiente donde hay un aumento del estrés de RE (como es el caso de la obesidad), y esto provoca un aumento en la apoptosis de las células β , una disminución de la secreción de insulina y finalmente el desarrollo de diabetes. (Quan *et al.*, 2012). En general, estos estudios ponen de manifiesto el importante papel que juega la autofagia en el mantenimiento de la función β pancreática bajo condiciones de estrés de RE, y su implicación en el desarrollo de la DM2.

Aunque la autofagia se considera generalmente protectora en las células β por su implicación en la eliminación de agregados proteicos y mitocondrias dañadas, algunos estudios han sugerido que la muerte celular por autofagia contribuye a la pérdida de células β (Fujimoto *et al.*, 2009; Masini *et al.*, 2009). Así, por ejemplo, en un estudio en el que analizaron los islotes pancreáticos de muestras humanas, se observó que en los pacientes con DM2 había una alta acumulación de vacuolas autofágicas y autofagolisosomas en comparación con los sujetos control, y este hecho se asoció con un aumento de las células β muertas con sobrecarga vacuolar en su interior, sugiriendo una alteración de la autofagia en las células β de pacientes con DM2 que puede contribuir a la pérdida de masa β pancreática en humanos (Masini *et al.*, 2009).

En el músculo esquelético, la autofagia es esencial para mantener una correcta función mitocondrial. En este sentido, se ha visto que el músculo de ratones que no expresan *Atg7* presenta una alteración de la morfología mitocondrial, un aumento de la liberación de ERO, y una disminución de la tasa de respiración mitocondrial (Wu *et al.*, 2009). Además, la autofagia en el músculo esquelético parece estar implicada en la utilización de glucosa y la sensibilidad a la insulina. He y colaboradores demostraron que el ejercicio físico induce autofagia en el músculo esquelético; sin embargo, cuando se bloquea la estimulación de la ruta de la autofagia, la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática (que se promueve también con el ejercicio) se ve reducida y, por tanto, disminuye la captación de glucosa por parte de la célula muscular. En este estudio demostraron que la autofagia contribuye a los efectos positivos sobre la tolerancia a la glucosa que proporciona el ejercicio en ratones alimentados con una dieta rica en grasa (He *et al.*, 2012).

Para terminar, estudios realizados en pacientes obesos con DM2 han observado un aumento de la autofagia en sus adipocitos (Ost *et al.*, 2010). La autofagia participa en el remodelado del citoplasma durante la adipogénesis y es fundamental para la diferenciación de adipocitos en tejido adiposo blanco (Singh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). La supresión de la autofagia en el

tejido adiposo de ratones, mediante la inhibición del gen *Atg7*, resulta en una alteración de la diferenciación del tejido adiposo blanco, un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos, una disminución de la grasa corporal, y una mejora en la sensibilidad a la insulina y la utilización de glucosa (Singh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la inhibición de la autofagia en el tejido adiposo podría utilizarse como una posible estrategia para prevenir la expansión de grasa y el desarrollo de resistencia a la insulina.

1.6. Hipótesis y objetivos

Aunque la alimentación y los hábitos de vida tienen una gran influencia en el desarrollo de la DM2, la capacidad de respuesta de cada individuo a las condiciones ambientales depende en gran medida de su carga genética. Puesto que la DM2 es un trastorno metabólico, y la mitocondria juega un papel fundamental en el metabolismo, nos preguntamos si alguna de las variaciones comunes del ADNmt, conocidas como haplogrupos mitocondriales, podrían estar relacionadas con las características metabólicas de los pacientes con DM2 y su predisposición a desarrollar complicaciones vasculares como la nefropatía diabética.

Numerosas evidencias reflejan la existencia de estrés oxidativo en la DM2, que viene principalmente condicionado por la hiperglucemia, y que podría constituir la base de las alteraciones moleculares que tienen lugar durante el curso natural de la enfermedad. Junto al estrés oxidativo, la activación crónica de la respuesta inflamatoria y la disfunción endotelial, se consideran procesos clave en el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas a la DM2, que limitan sustancialmente la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, los leucocitos son células inmunitarias que, además de participar en la inducción de estrés oxidativo y jugar un papel fundamental en la inflamación crónica de los pacientes con DM2, son clave en las primeras etapas del proceso aterosclerótico al ser reclutados hacia la pared vascular. Sin embargo, no están del todo claros ni los mecanismos moleculares que condicionan las interacciones de los leucocitos con el endotelio, ni si el tratamiento con metformina (fármaco de primera línea en el tratamiento de la diabetes) influye sobre ellos. Por estos motivos, nos planteamos si la dinámica mitocondrial en leucocitos de pacientes con DM2 podría verse afectada por el grado de control glucémico, condicionando así su función mitocondrial y las interacciones leucocito-endotelio. Además, dado el conocido papel beneficioso de la metformina sobre el endotelio y la producción de ERO en otros tipos celulares, nos preguntamos si existen diferencias en las interacciones leucocito-endotelio y los mecanismos moleculares relacionados con el estrés oxidativo (como la regulación de los sistemas antioxidantes, el estrés de RE y la autofagia) entre los leucocitos obtenidos de pacientes diabéticos tratados con metformina y los de pacientes no tratados con este fármaco.

Por lo tanto, los objetivos de la presente tesis doctoral son:

1. Evaluar el impacto de los haplogrupos mitocondriales más frecuentes de la población española sobre las características metabólicas y los marcadores de función renal de pacientes con DM2 y controles sanos.

1. TEMÁTICA

2. Determinar el papel del control glucémico sobre la función mitocondrial, la producción de ERO, y la expresión de proteínas que participan en la fusión y fisión mitocondrial, en leucocitos de pacientes con DM2, comparando con leucocitos de voluntarios sanos; así como la relación de estos mecanismos con las interacciones leucocito-endotelio.

3. Estudiar las posibles diferencias en la producción de ERO, la expresión de enzimas implicadas en la defensa antioxidante, y las interacciones con el endotelio, de leucocitos aislados de pacientes diabéticos tratados y no tratados con metformina y voluntarios sanos, así como sus niveles circulantes de moléculas de adhesión.

4. Analizar la activación de las diferentes rutas de la UPR, el proceso de autofagia, y la relación de éstos con el estrés oxidativo en leucocitos de pacientes con DM2 que siguen o no tratamiento con metformina y controles sanos.

2. PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cambios en el estilo de vida que ha experimentado la sociedad en los últimos años nos han conducido a un sedentarismo cada vez más pronunciado y a unos hábitos alimenticios que distan mucho de lo saludable. La epidemia del sobrepeso y la obesidad que estamos sufriendo, ha provocado un aumento drástico en la incidencia de alteraciones metabólicas como la DM2 y de enfermedad cardiovascular prematura, que tienen un impacto alarmante sobre la mortalidad y discapacidad a nivel mundial. Por tanto, el conocimiento y tratamiento de la DM2 se ha convertido en un reto para la sanidad pública, que requiere del esclarecimiento de los mecanismos moleculares implicados en su etiología para fomentar el desarrollo de fármacos e intervenciones terapéuticas que nos permitan combatir la patología y prevenir sus complicaciones asociadas.

En la presente tesis doctoral nos hemos propuesto estudiar la importancia que algunos de los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la DM2 tienen sobre los leucocitos de pacientes con esta patología. Para ello, se han llevado a cabo estudios observacionales donde se han analizado distintas cohortes de pacientes con DM2 atendidos en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Dr. Peset para su tratamiento y seguimiento habitual. Así mismo, y con el fin de comparar los resultados con la población sana, se incluyeron en los estudios los correspondientes controles sanos ajustados, dentro de lo posible, por edad y sexo.

De manera general, la edad de los pacientes diabéticos estudiados estaba en torno a los 60 años, con un tiempo promedio de duración de la diabetes de 10 años. Todos los pacientes estaban sometidos a recomendaciones dietéticas y pautas para aumentar la actividad física. La gran mayoría seguían además tratamiento farmacológico con agentes antidiabéticos, siendo la metformina el fármaco más utilizado (prescrito en aproximadamente el 70% de los pacientes estudiados). Como era de esperar, la población diabética presentó una alteración en la homeostasis de la glucosa, con elevados niveles plasmáticos de glucosa en ayunas y un porcentaje de HbA_{1c} significativamente superior al de los controles sanos; así mismo, los pacientes presentaban mayores niveles de insulina. Estos datos hacían prever la presencia de una marcada resistencia a la insulina, que se corroboró al observar el incremento en los valores del índice HOMA-IR.

En condiciones de hiperglucemia, los capilares de la microvasculatura de los ojos, riñones y tejidos periféricos se ven alterados dando lugar al desarrollo de complicaciones microvasculares (Brownlee, 2001; Chawla *et al.*, 2016). Por ello, el mantenimiento de un buen control glucémico en los pacientes con diabetes es primordial a la hora de prevenir la nefropatía, retinopatía y

neuropatía diabéticas (Stratton *et al.*, 2000). En esta tesis, hemos establecido el punto de corte para el buen control glucémico en valores de $HbA_{1C} \leq 6,5\%$, basándonos en los criterios de diagnóstico de la DM2 y en estudios que respaldan esta cifra como un punto de inflexión en el desarrollo de complicaciones microvasculares de la diabetes (ADVANCE Collaborative Group *et al.*, 2008; American Diabetes Association, 2018a; Zoungas *et al.*, 2012). Los pacientes diabéticos de nuestra cohorte mostraron un leve descenso de la función renal en comparación con los sujetos sanos, evidente por el incremento en la concentración sérica de creatinina y la disminución en la tasa de filtrado glomerular (FG) estimado. Estos hechos nos hacen sospechar que, en el futuro, muchos de ellos podrían desarrollar nefropatía diabética y, en consecuencia, fallo renal.

Nuestra población diabética se caracterizó por la presencia de sobrepeso y obesidad, con un IMC y perímetro abdominal significativamente superior al de los controles. Además, observamos un aumento de los niveles de PCR, indicativo de una inflamación sistémica de bajo grado. Dado que las diferencias en los niveles de PCR entre diabéticos y controles desaparecían al ajustar por IMC, consideramos que el exceso de peso presente en nuestra población diabética juega un papel primordial en el aumento observado en este marcador de inflamación sistémica. El balance calórico positivo que tiene lugar durante la obesidad provoca una hipertrofia de los adipocitos, que hace que comiencen a secretar citoquinas proinflamatorias y que se produzca una infiltración progresiva de macrófagos al tejido adiposo, hecho que aumenta aún más la liberación de estas citoquinas hacia la circulación (van Greevenbroek *et al.*, 2013). Una de ellas, la IL-6, es responsable de inducir la síntesis hepática de proteínas de fase aguda como la PCR o el fibrinógeno (Schmidt-Arras y Rose-John, 2016). Como consecuencia de estas acciones, se desarrolla un estado de inflamación crónica de bajo grado que está ligado a la resistencia a la insulina. De acuerdo con esto, en humanos se ha observado que a medida que aumenta el IMC se produce un incremento gradual sistémico de los marcadores inflamatorios PCR, IL-6 y TNF- α y del HOMA-IR (Lopez-Domenech *et al.*, 2018b), mientras que en el tejido adiposo de ratones sometidos a una dieta rica en grasas se activa la ruta de JNK, aumenta la secreción de IL-6, y se promueve un descenso en la sensibilidad a la insulina en el hígado (Sabio *et al.*, 2008).

Es importante destacar que los pacientes diabéticos estudiados presentaban un aumento en la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, con respecto a los controles; y que casi la mitad de los diabéticos estaban siendo tratados con algún tipo de terapia antihipertensiva. Una parte del exceso de riesgo cardiovascular que tienen los pacientes diabéticos puede atribuirse a la hipertensión coexistente (Petrie *et al.*, 2018). En este sentido, para evaluar la importancia de la

presión arterial sobre el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares en pacientes diabéticos, Chen y colaboradores diseñaron en 2011 un estudio en el que analizaban los datos de los participantes del estudio Framingham. En él, observaron que aquellos participantes que ya eran hipertensos en el momento del diagnóstico de la diabetes tenían más eventos cardiovasculares que los participantes diabéticos normotensos. Tras realizar los ajustes oportunos de covariables clínicas y demográficas, concluyeron que la hipertensión en pacientes diabéticos se asociaba con un aumento del 57% en el riesgo de eventos cardiovasculares (Chen *et al.*, 2011).

El perfil lipídico que presentan los pacientes diabéticos analizados muestra algunas de las características distintivas de la dislipidemia aterogénica (definida como hipertrigliceridemia acompañada de niveles reducidos de HDL y aumento de las partículas de LDL pequeñas y densas). De hecho, se puede observar un incremento pronunciado en los valores séricos de triglicéridos y un descenso en los niveles de colesterol HDL con respecto a la población control. La dislipidemia aterogénica es bastante frecuente entre los pacientes con DM2, su prevalencia varía entre el 35% y el 56%, y está estrechamente asociada con el riesgo cardiovascular (Taskinen y Boren, 2015). Cuando los cambios en el estilo de vida no son suficientes para evitar las alteraciones lipídicas de los pacientes con DM2, se recurre al tratamiento farmacológico hipolipemiante, donde las estatinas son la terapia de primera línea. En casos de alto riesgo en los que el tratamiento con estatinas no es suficiente para disminuir los niveles de LDL, se suelen asociar otros fármacos como ezetimibe o fenofibratos con el fin de reducir el riesgo cardiovascular mediante la optimización de los niveles de la triada lipídica: colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos (Szalat *et al.*, 2016). Aproximadamente el 55% de nuestros pacientes diabéticos seguían tratamiento con estatinas, mientras que algo más del 10% tomaban fibratos, y una pequeña parte (menos de un 5%) estaban tratados con ezetimibe. Por este motivo, los niveles de colesterol total y de LDL de los pacientes con DM2 no sólo no estaban aumentados con respecto a los controles sino que, como consecuencia del tratamiento farmacológico, estaban disminuidos.

Aunque los principales procesos influyentes en la epidemia global de DM2 son factores ambientales como el aumento de la obesidad, la falta de ejercicio físico, las dietas hipercalóricas y el envejecimiento de la población; la herencia genética de cada individuo puede determinar su respuesta a los cambios ambientales (Morris *et al.*, 2012). El descubrimiento de polimorfismos que permitan identificar individuos con alto riesgo de desarrollar DM2 puede ser de gran utilidad en el diseño de estrategias de prevención primaria. Además, la caracterización de variantes que determinen un peor pronóstico de la enfermedad una vez diagnosticada (mal control metabólico, predisposición al desarrollo de complicaciones vasculares, etc.) permitiría

adelantarnos al comienzo de la complicación y pautar el tratamiento que mejor se ajuste a las necesidades individuales para prevenir su aparición o retrasar su progresión. En este sentido, dado el importante papel que tiene la mitocondria en el metabolismo energético y en la fisiopatología de la DM2, el ADNmt es un buen candidato a presentar variantes que condicionen la función mitocondrial y predispongan al desarrollo de diabetes (Kwak y Park, 2016). El debate de si determinados haplogrupos mitocondriales podrían afectar al metabolismo energético y así contribuir al desarrollo de la DM2 continúa abierto debido a que, aunque algunos estudios han mostrado la existencia de una asociación entre determinados haplogrupos y el riesgo de diabetes (Crispim *et al.*, 2006; Feder *et al.*, 2009; Fuku *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007), otros muchos no pudieron encontrar tal asociación o incluso obtuvieron resultados contradictorios (Chinnery *et al.*, 2007; Mohlke *et al.*, 2005; Saxena *et al.*, 2006). Es por ello que en esta tesis doctoral nos planteamos determinar la prevalencia de los principales haplogrupos mitocondriales en una cohorte de 303 pacientes con DM2 y 153 controles sanos, y evaluar su posible relación con el control metabólico y la función renal. Los haplogrupos se definieron por la presencia de los siguientes polimorfismos: m.7028C>T o m.14766T>C para el haplogrupo HV; m.12308A>G para el U; y m.4216T>C para el JT (van Oven y Kayser, 2009), que abarcan el 90% de la población española (Dahmany *et al.*, 2006). Los pacientes que no presentaban ninguno de estos polimorfismos fueron incluidos en un cuarto grupo denominado “Otros” que englobaría al resto de haplogrupos minoritarios de la población. La distribución de los haplogrupos fue similar en el grupo de controles y de diabéticos, por lo que en nuestra población el hecho de pertenecer a uno de estos haplogrupos no parece estar asociado directamente con el desarrollo de DM2. Sin embargo, al centrarnos en los pacientes diabéticos y analizar los diferentes parámetros metabólicos en función de los haplogrupos, pudimos observar que aquellos pertenecientes al haplogrupo JT presentaban mayores niveles de glucosa en ayunas y HbA_{1c} que los pacientes con los haplogrupos HV, U y otros, indicando un peor control glucémico. Crispim y colaboradores publicaron un estudio en el 2006 donde se relacionaba el haplogrupo JT con una mayor resistencia a la insulina, determinada por el índice HOMA-IR, en pacientes caucásico-brasileños con DM2 (Crispim *et al.*, 2006). De forma similar, aunque no de manera estadísticamente significativa ($p = 0,38$), nuestros resultados también muestran un ligero aumento en el índice HOMA de los pacientes con el haplogrupo JT, apoyando la hipótesis de un posible papel de este haplogrupo en el mal control glucémico y la resistencia a la insulina.

La hiperglucemia mantenida en el tiempo da lugar a una producción excesiva de ERO y se considera la principal responsable del desarrollo de complicaciones microvasculares en los pacientes con DM2 (Brownlee, 2005; Giacco y Brownlee, 2010). El riñón es especialmente

susceptible al daño oxidativo producido por la hiperglucemia. Al no ser dependiente de insulina, la captación de glucosa por las células mesangiales del glomérulo y las células tubulares no está controlada, por lo que bajo condiciones de hiperglucemia crónica se produce en ellas un aumento de la producción de ERO que puede promover daños funcionales y estructurales y dar lugar al desarrollo de nefropatía diabética (Singh *et al.*, 2011). Curiosamente, además de un peor control glucémico, nuestros pacientes con el haplogrupo JT mostraron niveles mayores de creatinina en suero y una tasa estimada de FG inferior que aquellos pertenecientes al resto de haplogrupos, sugiriendo una peor función renal. Varios estudios han señalado que las variantes mitocondriales podrían influir sobre la susceptibilidad al desarrollo de complicaciones vasculares de la diabetes más que sobre la DM2 en sí misma. Por ejemplo, Achilli y colaboradores publicaron en 2011 un trabajo en el que genotiparon una cohorte de 904 sujetos de una región del centro de Italia (de los que 466 tenían DM2), y observaron que, aunque la susceptibilidad a desarrollar DM2 no parecía ser diferente en los distintos haplogrupos, sí que existía una asociación significativa entre determinados haplogrupos y un aumento en el riesgo de complicaciones vasculares. Así, los haplogrupos H, H3, V y U3 se asociaron con retinopatía, neuropatía, fallo renal y nefropatía, respectivamente (Achilli *et al.*, 2011). Al igual que el trabajo de Achilli y colaboradores, otros estudios han indicado un posible papel de los haplogrupos mitocondriales sobre las complicaciones vasculares de la diabetes, por ejemplo, el haplogrupo T se ha relacionado con enfermedad arterial coronaria y retinopatía diabética (Kofler *et al.*, 2009); el haplogrupo U es más frecuente en los pacientes diabéticos que no tienen complicaciones vasculares en comparación con los que tienen al menos una complicación, indicando un posible efecto protector (Martikainen *et al.*, 2015); los haplogrupos H y UK parecen estar involucrados en la severidad de la retinopatía diabética, aunque no se relacionan con su prevalencia, lo que indica que podrían estar implicados en los mecanismos fisiopatológicos que afectan al empeoramiento de esta complicación, como la isquemia y neovascularización características de la retinopatía diabética proliferativa (Bregman *et al.*, 2017). En cuanto al aumento en el riesgo de nefropatía diabética, se ha observado que está relacionado con el haplogrupo N9a en una población de origen chino (Niu *et al.*, 2015), y con el haplogrupo J1 en un grupo de pacientes judíos de origen asquenazí (Feder *et al.*, 2009). Entre las características típicas de la nefropatía diabética se encuentran una elevación de los niveles séricos de creatinina, que es debido al descenso de la tasa de FG, y un aumento del ratio albúmina/creatinina en la orina. Es por ello que decidimos analizar los datos del ratio urinario de albúmina/creatinina de aquellos pacientes diabéticos a los que se les había realizado esta medición el mismo día de la extracción sanguínea (n=106), y pudimos observar que los del haplogrupo JT mostraban niveles ligeramente superiores a los del resto de haplogrupos. Sin embargo, probablemente a causa de

la reducción en el tamaño muestral, estos datos no alcanzaron la significación estadística. En conjunto, nuestros resultados, aunque están en su mayoría dentro del rango considerado como no patológico, apuntan a un descenso en la función renal de los pacientes que pertenecen al haplogrupo JT, por lo que concuerdan con un posible papel de este haplogrupo en el desarrollo de nefropatía diabética.

Es de destacar que el haplogrupo JT se caracteriza por un polimorfismo o SNP en el nucleótido 4216 del ADNmt (m.4216T>C) (Herrnstadt *et al.*, 2002), que da lugar a un cambio no sinónimo en un codón del gen que codifica para la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (*MT-ND1*), uno de los componentes del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los polimorfismos que definen los haplogrupos mitocondriales se encuentran en homoplasmia y son considerados neutrales, es decir no patogénicos. Sin embargo, el polimorfismo m.4216T>C se ha asociado, junto a otros, con la neuropatía óptica de Leber, donde se cree que empeora los efectos de las otras mutaciones implicadas en la enfermedad pero no es suficiente por sí mismo para causarla (Torrioni *et al.*, 1997). A nivel funcional, se cree que éste y otros polimorfismos del ADNmt podrían afectar a la cinética del ensamblaje de los complejos mitocondriales (Pello *et al.*, 2008). Bajo las condiciones de hiperglucemia que tienen lugar en la DM2, el aumento en el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs lleva a una producción excesiva de NADH. El complejo I mitocondrial transfiere los electrones almacenados en el NADH al coenzima Q, de forma que una alteración en la función del complejo I así como un exceso de su sustrato (NADH) pueden provocar una fuga de electrones que reducirán moléculas de O₂ dando lugar a un aumento en la generación de O₂^{•-} (Murphy, 2009; Yan, 2014). En un estudio publicado recientemente se demostró que la inhibición del complejo I mitocondrial mejoraba la resistencia a la insulina y disminuía la hiperglucemia en ratones diabéticos a través de un aumento de la glucólisis y una disminución de la producción hepática de glucosa, por un mecanismo independiente de la activación de la AMPK (Hou *et al.*, 2018). Todo ello nos lleva a hipotetizar que en los pacientes con DM2 ocurrirían una serie alteraciones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial que se verían agravadas en los pacientes con haplogrupo JT. El polimorfismo m.4216T>C podría agravar las consecuencias de la hiperglucemia a través de una posible afectación del complejo I mitocondrial que daría lugar a un aumento en la liberación de ERO. En las células renales, este exceso de ERO provocaría una alteración de la función renal que con el tiempo podría desencadenar en el desarrollo de nefropatía diabética. Para confirmar esta hipótesis serán necesarios estudios donde se evalúe la función mitocondrial en general, y de las diferentes subunidades del complejo I en particular, en pacientes con DM2 pertenecientes a diferentes haplogrupos.

También sería interesante la realización de estudios prospectivos donde se haga un seguimiento a largo plazo de la función renal en pacientes diabéticos con distintos haplogrupos para confirmar un aumento de la incidencia de nefropatía diabética en aquellos pertenecientes al haplogrupo JT. En caso de corroborarse nuestra hipótesis, la determinación del haplogrupo mitocondrial en pacientes con DM2 de reciente diagnóstico nos permitiría predecir un peor control glucémico en aquellos con el polimorfismo m.4216T>C e iniciar estrategias de tratamiento enfocadas a la prevención del daño renal causado por hiperglucemia. Así, el tratamiento farmacológico temprano con inhibidores del complejo I mitocondrial, como la metformina y las tiazolidinedionas (Brunmair *et al.*, 2004), de los pacientes diabéticos con haplogrupo JT podría ser una buena estrategia para mejorar la homeostasis de la glucosa y prevenir la alteración de la función renal.

Como hemos visto, los pacientes con DM2 presentan un aumento de los niveles circulantes de marcadores inflamatorios que reflejan un estado de inflamación subclínica crónica. En la DM2 existe una alteración del sistema inmune donde, entre otras cosas, se han observado cambios en el número y el estado de activación de los leucocitos circulantes que contribuyen al aumento en la liberación de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias (Donath y Shoelson, 2011). Estos leucocitos activados son capaces de adherirse al endotelio de los vasos sanguíneos dando lugar al inicio de un proceso aterosclerótico, en muchos casos prematuro, que se encuentra íntimamente relacionado con el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes (Weber y Noels, 2011). Además, la situación se puede ver agravada por el daño vascular que ocurre en condiciones de hiperglucemia y que tiene mucho que ver con el aumento del estrés oxidativo (Kaur *et al.*, 2018). Los leucocitos, una vez activados, son capaces de producir y liberar gran cantidad de ERO contribuyendo al estrés oxidativo y a la subsecuente inflamación y disfunción endotelial (Mittal *et al.*, 2014). De hecho, estudios previos han constatado la existencia de estrés oxidativo en los leucocitos y activación de los mismos en pacientes con DM2, destacando su posible papel en el desarrollo de complicaciones macro y microvasculares (Hernandez-Mijares *et al.*, 2013; Rovira-Llopis *et al.*, 2013; Shurtz-Swirski *et al.*, 2001). Por todo esto, consideramos que estas células son buenas candidatas para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la fisiopatología de la DM2, y decidimos emplear leucocitos de sangre periférica en nuestras investigaciones. Los resultados obtenidos confirman que los leucocitos de pacientes con DM2 presentan un aumento en la producción de ERO, tanto mitocondriales como totales, y un descenso en la tasa de consumo de O₂ mitocondrial, que apunta a una alteración de la función mitocondrial. Cuando separamos en dos grupos a nuestra población diabética, en función de si tenían un buen control glucémico (HbA_{1c} < 6,5%) o si

estaban mal controlados ($HbA_{1c} > 6,5\%$), observamos que mientras que el aumento de la producción de ERO mitocondriales y totales era similar en ambos grupos, la disminución en la respiración mitocondrial ocurría específicamente en los leucocitos de los pacientes mal controlados. Además, el consumo de O_2 mitocondrial se correlacionó negativamente con el aumento en los niveles de HbA_{1c} , sugiriendo que la disfunción mitocondrial se ve agravada por una exposición prolongada a concentraciones elevadas de glucosa.

La correcta función mitocondrial está condicionada por el ensamblaje de redes de mitocondrias que sufren ciclos continuos de fusión y fisión para la adaptación de la célula a los cambios energéticos, un mecanismo conocido como dinámica mitocondrial. Se ha observado que asociado a la diabetes existe un desequilibrio entre los procesos de fusión y fisión que llevan a una fragmentación mitocondrial en distintos tipos celulares, como células musculares, endoteliales y β pancreáticas (Bach *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2009; Shenouda *et al.*, 2011). Los defectos en la maquinaria encargada de mediar la fusión y fisión mitocondrial condicionan negativamente la bioenergética celular, ya que promueven una reducción en el potencial de membrana mitocondrial, un mal funcionamiento de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y un descenso de la respiración mitocondrial (Westermann, 2010). Hasta donde sabemos, nuestro trabajo es el primero en estudiar la expresión de las proteínas de fusión y fisión en leucocitos de pacientes con DM2 y controles sanos. En este estudio, hemos observado que la expresión de las proteínas de fusión MFN1, MFN2 y OPA1 es significativamente menor en los leucocitos de los pacientes diabéticos en comparación con los de los voluntarios sanos. A su vez, existe un aumento en la expresión de las proteínas de fisión FIS1 y DRP1 (aunque la significación estadística no fue alcanzada en el caso de DRP1). Cuando dividimos el grupo de pacientes diabéticos en función del control glucémico, pudimos ver que el descenso en la expresión de las proteínas de fusión MFN2 y OPA1 era más marcado en los pacientes mal controlados (con niveles de $HbA_{1c} > 6,5\%$). Además, esta disminución de los niveles de MFN2 y OPA1 en paralelo al aumento de los niveles de HbA_{1c} se corroboró tras observar una correlación negativa entre ambos parámetros, indicando que la pérdida del control glucémico podría inhibir la fusión mitocondrial. Nuestros resultados se ven apoyados por un trabajo publicado con posterioridad, donde se observó una correlación negativa entre los niveles de HbA_{1c} y la expresión tanto proteica como de ARNm de MFN2 en PBMCs de pacientes con DM2 (Bhansali *et al.*, 2017).

MFN2, además de participar en el proceso de fusión mitocondrial, está implicada en otras funciones celulares de gran importancia. Por ejemplo, MFN2 parece jugar un papel en el metabolismo mitocondrial, ya que cuando se pierde la función de esta proteína se ven

reducidos la oxidación de sustratos, el consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial en células musculares de ratón (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005). También se ha visto que MFN2 es capaz de regular la señalización de la insulina, está implicada en la homeostasis del Ca^{2+} , y puede controlar la función del RE. De hecho, se ha demostrado que esta proteína juega un papel en la UPR (Sebastian *et al.*, 2012). En este sentido, la pérdida de la función de MFN2 provoca un aumento en los marcadores de estrés de RE en músculo esquelético e hígado de ratón; e *in vitro* en fibroblastos embrionarios de ratón (Ngho *et al.*, 2012; Sebastian *et al.*, 2012). En concreto, Muñoz y colaboradores sugieren que MFN2 interacciona con PERK y modula negativamente su actividad quinasa; de manera que, en ausencia de MFN2, el aumento de la actividad de PERK es capaz de controlar la morfología y función mitocondrial (Muñoz *et al.*, 2013). Es de destacar que existen algunas controversias en cuanto a si la falta de MFN2 provoca o previene la activación de la apoptosis, aunque paradójicamente lo que sí que está claro es que la ausencia de la actividad de MFN2 promueve un aumento de la expresión de CHOP (Muñoz *et al.*, 2013; Ngho *et al.*, 2012). En consonancia con esta idea, nuestros resultados muestran una disminución en la expresión proteica de MFN2 en pacientes con mal control glucémico, mientras que en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se observó, también en leucocitos, un aumento en la expresión de CHOP en una cohorte diferente de pacientes mal controlados (Rovira-Llopis *et al.*, 2014).

De manera similar a MFN2, OPA1 también interviene en funciones pleiotrópicas, de hecho, se sabe que OPA1 participa en el mantenimiento de la integridad de las crestas mitocondriales (Frezza *et al.*, 2006), el estrés oxidativo (Millet *et al.*, 2016) y la inflamación (Tezze *et al.*, 2017), además de su papel clave en la plasticidad mitocondrial (Youle y van der Blik, 2012). Así, OPA1 podría estar implicada en la organización de los complejos de la cadena de transporte de electrones y en la eficiencia de la respiración, mediante el control de la disposición de las crestas mitocondriales (Cogliati *et al.*, 2013). De acuerdo con ello, un trabajo reciente ha confirmado que la ausencia del gen *Opa1* en fibroblastos embrionarios de ratón provoca alteraciones del metabolismo energético que son consecuencia de defectos en la cadena respiratoria e importantes descensos de la respiración mitocondrial (Bocca *et al.*, 2018). Por lo tanto, las alteraciones en la expresión de OPA1 también tienen un impacto sobre el metabolismo mitocondrial.

Curiosamente, los niveles de expresión de MFN1 no seguían el mismo patrón que MFN2 y OPA1, sino que eran los leucocitos de los pacientes bien controlados los que mostraban de manera significativa una menor cantidad de MFN1 que los controles. Nuestros resultados concuerdan con los de un estudio en el que generaron ratones “knock out” para MFN1

específicamente en el hígado. En dicho trabajo observaron que, cuando eran alimentados con una dieta rica en grasas, los ratones “knock out” mostraban una reducción de los niveles de glucosa en sangre y una mejor sensibilidad a la insulina, en comparación con ratones normales alimentados con la misma dieta. De hecho, la falta de MFN1 protegió a los ratones de la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta rica en grasas que sí se observó en los ratones “wild type”. Además, la acción hipoglucemiante de la metformina aumentó en los ratones deficientes en MFN1 (Kulkarni *et al.*, 2016), por lo que estrategias farmacológicas que apunten hacia una reducción de la actividad de MFN1 podrían ser de gran utilidad para el manejo de la homeostasis de la glucosa en situaciones de resistencia a la insulina o DM2 (Kulkarni *et al.*, 2016).

En cuanto a la fisión, varios trabajos han señalado una mayor fragmentación de las redes mitocondriales bajo condiciones de hiperglucemia en células endoteliales, pancreáticas y hepáticas (Makino *et al.*, 2010; Men *et al.*, 2009; Shenouda *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2006). En la presente tesis, hemos demostrado que el aumento de la expresión de las proteínas FIS1 y DRP1 en los leucocitos de pacientes diabéticos se agrava en condiciones de mal control glucémico, ya que los niveles de ambas proteínas se incrementaron específicamente en el grupo de pacientes con HbA_{1c} > 6,5% (aunque en el caso de DRP1 no se alcanzó la significación estadística). Además, hemos observado una correlación negativa entre los niveles de las dos proteínas de fisión analizadas y el consumo de O₂ mitocondrial, lo que podría indicar que un aumento excesivo del proceso de fisión compromete la función mitocondrial en los leucocitos de pacientes con DM2. De acuerdo con esta idea, el trabajo de Jheng y colaboradores demostró que la pérdida de redes mitocondriales, que ocurría por un aumento de la fisión en células musculares tratadas con palmitato, promueve disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina (Jheng *et al.*, 2012). Por otro lado, la correlación negativa entre la fisión y el consumo de O₂ mitocondrial se puede interpretar de forma inversa; es decir, la alteración de la función mitocondrial (que empeora con el mal control glucémico) podría promover un aumento en la fisión de las redes mitocondriales que serviría como mecanismo de defensa para permitir la eliminación de los componentes mitocondriales dañados por mitofagia. Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados de Twig y colaboradores, que sugieren que los eventos de fisión en mitocondrias de células β pancreáticas son seguidos por un proceso de fusión selectiva que permite la segregación de mitocondrias dañadas y su eliminación por autofagia (Twig *et al.*, 2008).

La fisión mitocondrial se ha postulado como un mecanismo clave en el desarrollo de aterosclerosis en pacientes con DM2, al demostrarse que la fragmentación de la red

mitocondrial de las células endoteliales contribuye a la disfunción endotelial (Shenouda *et al.*, 2011). Dada la importancia de la activación y reclutamiento de leucocitos hacia el endotelio vascular en el proceso aterosclerótico (Weber y Noels, 2011), decidimos investigar si existía alguna relación entre la interacción leucocito-endotelio y la alteración en la dinámica mitocondrial en los leucocitos. Para ello, utilizando una cámara de flujo paralelo, perfundimos una suspensión de los leucocitos aislados de nuestros pacientes sobre una monocapa de células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) procedentes de mujeres voluntarias sanas, y determinamos tres parámetros: (i) la velocidad de rodamiento leucocitario (el tiempo que tardan 20 leucocitos consecutivos en recorrer una distancia de 100 μm), (ii) el flujo de rodamiento leucocitario (número de leucocitos que ruedan sobre una superficie de 100 μm^2 de células endoteliales durante un periodo de tiempo de 1 min), y (iii) adhesión leucocitaria (número de leucocitos que mantienen un contacto estable con la monocapa de HUVEC de al menos 30s). Observamos que los leucocitos de pacientes con DM2 rodaban más despacio sobre el endotelio, y que el flujo de rodamiento y la adhesión eran mayores en comparación con los leucocitos de los sujetos sanos. Además, al dividir por HbA_{1c} al grupo diabético, observamos que el número de leucocitos que ruedan sobre el endotelio era mayor en el grupo de los pacientes mal controlados en comparación con los bien controlados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores, donde el aumento de las interacciones leucocito-endotelio se asoció no sólo con un mal control glucémico, sino también con disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, estrés de RE, y un aumento de complicaciones microvasculares (como la nefropatía diabética) y macrovasculares (como la cardiopatía isquémica silente) (Hernandez-Mijares *et al.*, 2013; Rovira-Llopis *et al.*, 2013; Rovira-Llopis *et al.*, 2014). Con nuestro estudio, hemos ampliado esta lista y hemos incluido en ella a la alteración de la dinámica mitocondrial, pues el análisis estadístico de nuestros datos muestran que la velocidad de rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio se correlaciona negativamente con los niveles de la proteína de fisión FIS1, y positivamente con los niveles de las proteínas de fusión MFN1 y OPA1. Por otro lado, encontramos una correlación negativa entre la adhesión leucocitaria y la expresión de MFN1 y DRP1. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la alteración de la dinámica mitocondrial que ocurre en los leucocitos de los pacientes con DM2, especialmente cuando el control glucémico es inadecuado, estaría asociada con un aumento de las interacciones de los leucocitos con el endotelio. Hasta la fecha, no existe ningún estudio en el que se investigue directamente si la alteración de la dinámica mitocondrial en los leucocitos es capaz de promover una mayor interacción de los mismos con el endotelio vascular, aunque lo que sí que se ha visto es que la dinámica mitocondrial es esencial durante la polarización y quimiotaxis linfocitaria (Campello *et al.*, 2006). De hecho, Campello y colaboradores demostraron que,

durante la migración linfocitaria, la red mitocondrial sufre una serie de reordenamientos que conducen a la acumulación de mitocondrias específicamente en la región del urópodo, donde son requeridas para asegurar la elevada producción de ATP necesaria para el reordenamiento del citoesqueleto. Así, observaron que la fisión mitocondrial facilitaba este proceso de relocalización de las mitocondrias y promovía la quimiotaxis de los linfocitos, mientras que la fusión (estimada por un aumento en la expresión de OPA1, MFN1 o por la inhibición de DRP1) era capaz de inhibir ambos procesos (Campello *et al.*, 2006; Campello y Scorrano, 2010). Finalmente, nuestros resultados mostraron la existencia de una correlación positiva entre el aumento de la presión arterial sistólica y una mayor expresión de la proteína de fisión mitocondrial FIS1 en los leucocitos. La hipertensión es un importante marcador de riesgo cardiovascular que se caracteriza, entre otras cosas, por un aumento de la vasoconstricción. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento con inhibidores de la fisión mitocondrial previene la constricción inducida por fenilefrina en arterias mesentéricas humanas y aortas procedentes de ratón y rata, indicando un papel del proceso de fisión mitocondrial sobre la vasoconstricción (Liu *et al.*, 2016).

Por tanto, la pérdida del control glucémico en los pacientes con DM2 podría venir acompañada de un desequilibrio en los procesos de fusión y fisión mitocondrial que llevarían a un aumento de la producción de ERO, acrecentando así la disfunción mitocondrial y promoviendo la activación leucocitaria. Como resultado, nos encontramos ante un aumento del reclutamiento de los leucocitos hacia la pared vascular que empeora con la hiperglucemia prolongada, y que puede favorecer el proceso aterosclerótico que conduce al desarrollo de complicaciones vasculares en los pacientes con DM2.

Tras conocer la importancia del control glucémico sobre la función mitocondrial en leucocitos de pacientes con DM2 y el contacto de éstos con el endotelio sano, y dado el posible papel que puede desempeñar la metformina sobre la producción de ERO y la función vascular, nos preguntamos si los leucocitos de pacientes tratados con metformina poseen algún tipo de mejora a nivel de estrés oxidativo y de interacciones leucocito-endotelio en comparación con los leucocitos de pacientes no tratados con este agente antihiper glucemiante y, de ser así, qué mecanismos podrían estar involucrados en tal beneficio. Para ello, reclutamos pacientes diabéticos que llevaban al menos un año tomando metformina como principal agente antidiabético a una dosis de 1700 mg diarios y otro grupo de pacientes con DM2 que no estaban siendo tratados con este fármaco. En ninguno de los dos grupos se incluyeron pacientes que siguieran tratamiento con insulina; y, para evitar la influencia del control glucémico sobre los resultados, se ajustaron por niveles de glucosa, insulina y HbA_{1c} además de

por sexo, edad e IMC. Asimismo, incluimos un grupo de controles sanos no obesos, ajustados por edad y sexo, para poder observar los cambios debidos a la presencia de DM2. Tras evaluar por microscopía de fluorescencia la producción de ERO y los niveles de GSH en los leucocitos aislados de los sujetos de estudio, observamos que los pacientes diabéticos presentaban mayores niveles de ERO, tanto totales como mitocondriales, y menor concentración intracelular de GSH en comparación con los leucocitos de controles sanos. A diferencia de los niveles totales de ERO, que eran similares en ambos grupos de pacientes diabéticos, la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial fue significativamente menor en los leucocitos de los pacientes tratados con metformina en comparación con los de pacientes no tratados, mientras que los niveles del antioxidante GSH eran superiores. Cuando evaluamos la expresión de ARNm de las principales enzimas encargadas de la defensa frente al estrés oxidativo, observamos que los leucocitos de pacientes tratados con metformina tenían unos niveles de expresión génica de *GPX1* y *SIRT3* superiores a los que no llevaban tratamiento con metformina (cuya expresión era muy inferior a la de los controles). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la expresión de ARNm de *SOD1* y *CAT* entre los tres grupos. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con metformina de los pacientes diabéticos podría reducir el estrés oxidativo que presentan sus leucocitos a través de una inhibición de la producción mitocondrial de ERO, un aumento de los niveles de GSH, y un incremento de la expresión de *GPX1* y *SIRT3*.

En la DM2, el exceso de ERO generados por la mitocondria puede dañar el ADN, las proteínas y los componentes lipídicos de las membranas, resultando en disfunción mitocondrial. Es de destacar que, en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, se demostró que la disfunción mitocondrial observada en los leucocitos de pacientes con DM2 estaba relacionada con un aumento del estrés oxidativo y una alteración de la función del complejo I de la cadena de transporte de electrones (Hernandez-Mijares *et al.*, 2011). Este complejo es uno de los principales lugares de producción de $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria (Murphy, 2009), por lo que la metformina, a través de su acción inhibitoria sobre él, podría ser capaz de reducir la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial en los leucocitos de pacientes diabéticos tratados con el fármaco. De hecho, se ha demostrado que este fármaco no sólo no aumenta la producción de ERO en el complejo I mitocondrial debido al flujo directo de electrones, sino que además es capaz de inhibir su producción debida al transporte reverso de electrones en mitocondrias aisladas de hígado de rata (Batandier *et al.*, 2006).

SIRT3 es la principal deacetilasa mitocondrial, cuya función es clave para la activación del sistema de defensa antioxidante y el mantenimiento de la correcta función mitocondrial en situaciones de estrés (Bell *et al.*, 2011; Hirschey *et al.*, 2011a). Se ha demostrado que la

exposición prolongada a una dieta rica en grasas reduce la expresión de SIRT3, y que la disminución de la actividad de esta enzima en ratones (ya sea por inactivación génica o por dieta rica en grasas) está asociada con el desarrollo acelerado de alteraciones metabólicas (Hirschey *et al.*, 2011b). Este hecho explicaría, al menos en parte, el descenso en la expresión de *SIRT3* que hemos observado en los leucocitos de los pacientes con DM2. Nuestros resultados muestran, además, que en los pacientes diabéticos tratados con metformina tienen niveles de SIRT3 superiores a los no tratados. En relación a esto, curiosamente, en un estudio llevado a cabo con ratones, observaron que la metformina reducía la expresión proteica de SIRT3 en el hígado (Buler *et al.*, 2012). Estas discrepancias con nuestros resultados pueden tener que ver con el tipo celular estudiado o bien con la dosis y duración del tratamiento, ya que en el estudio de Buler y colaboradores los ratones fueron tratados sólo durante 7 días y la dosis de metformina administrada (300 mg/kg) fue muy superior a la de nuestros pacientes. En este sentido, se ha visto que el mismo estímulo en diferentes circunstancias puede desencadenar respuestas contrarias en la expresión de SIRT3. Así, por ejemplo, se ha observado que aunque la exposición crónica a una dieta rica en grasas provoca la inhibición de la expresión proteica de SIRT3, cuando la exposición a la dieta rica en grasas es aguda, la expresión de SIRT3 aumenta (Hirschey *et al.*, 2011a). Entre las proteínas que se incluyen como diana de SIRT3 se encuentra la isocitrato deshidrogenasa 2, cuya activación por deacetilación resulta en un aumento de la producción de NADPH, una molécula esencial para la reducción de GSSG a GSH (Bause y Haigis, 2013). El GSH puede ejercer su acción antioxidante neutralizando ERO de una manera directa o, indirectamente, sirviendo como donador de electrones a enzimas antioxidantes como la GPX (capaz de reducir H₂O₂ y grupos tiol de proteínas oxidadas) (Deponete, 2013). En este sentido, se ha postulado que SIRT3 podría participar en la regulación de *Gpx*, ya que cuando se suprime la expresión génica de *Sirt3* en células musculares de ratón, la inducción de la expresión de *Gpx* vía PGC-1 α se ve reducida (Kong *et al.*, 2010). Nuestros resultados respaldan que en los leucocitos de pacientes tratados con metformina existe un aumento de la expresión génica de *SIRT3* que podría estar favoreciendo un incremento en los niveles intracelulares de GSH y una mayor expresión de *GPX1*.

El uso de la metformina como tratamiento antidiabético de primera línea no sólo se debe a sus efectos antihiperglucemiantes, sino que también tiene que ver con los beneficios que supone a nivel vascular y su papel en la reducción de la mortalidad de los pacientes con DM2. En una revisión sistemática en la que se analizaron 40 ensayos clínicos controlados, se sugirió que la metformina disminuía el riesgo de mortalidad cardiovascular en comparación con otros agentes antidiabéticos orales o placebo (Selvin *et al.*, 2008). Los mecanismos implicados en la protección

vascular asociada al tratamiento con metformina tienen mucho que ver con mejoras en la función endotelial, el perfil lipídico y marcadores inflamatorios (Pernicova y Korbonits, 2014). La evaluación de las interacciones leucocito-endotelio que hemos realizado en esta tesis doctoral muestra que los leucocitos de pacientes tratados con metformina tienen una velocidad de rodamiento mayor y un flujo de rodamiento y adhesión al endotelio menor que los leucocitos de pacientes no tratados con el fármaco. Esta reducción en la interacción leucocito-endotelio viene acompañada por un descenso en los niveles de las formas solubles de ICAM-1 y P-selectina en la sangre de los pacientes tratados con metformina en comparación con los elevados niveles observados en los pacientes no tratados con metformina (aunque, en el caso de la P-selectina, este descenso no alcanzó la significación estadística, $p = 0,08$). P-selectina e ICAM son moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales que participan en los procesos de rodamiento y adhesión de los leucocitos respectivamente; y el aumento en la circulación de sus formas solubles se considera un marcador indirecto de activación endotelial. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los del estudio de Jager y colaboradores, donde demostraron que el tratamiento con metformina a largo plazo disminuía los niveles circulantes de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM en pacientes con DM2 (de Jager *et al.*, 2014). Continuando con los efectos de la metformina sobre la vasculatura, en un estudio realizado con células endoteliales humanas expuestas a citoquinas inflamatorias, se demostró que la metformina atenúa la expresión génica de las moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias al inhibir la activación del factor proinflamatorio NF- κ B, mediante el aumento de la actividad de la AMPK (Hattori *et al.*, 2006). Por otra parte, la activación de la AMPK promovida por metformina hace que se fosforile e inactive la poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) (Shang *et al.*, 2016), una enzima que se activa cuando hay daño oxidativo en el ADN y cuya inactivación parece revertir la disfunción endotelial inducida por diabetes (Soriano *et al.*, 2001). Pero los beneficios antiaterogénicos del tratamiento con metformina van todavía más allá, de hecho es capaz de modificar la distribución de subfracciones lipoproteicas en personas intolerantes a la glucosa, reduciendo ligeramente los niveles de partículas LDL pequeñas y densas, y aumentando los de HDL (Goldberg *et al.*, 2013).

En conjunto, nuestros resultados sugieren una mejora del estrés oxidativo y la función vascular de los pacientes tratados con metformina, y apoyan un papel protector de este fármaco en las primeras etapas del proceso aterosclerótico cuando los leucocitos son reclutados hacia las paredes de los vasos sanguíneos.

Entre los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la DM2 se encuentra el estrés de RE, que parece jugar un papel fundamental en la inhibición de la acción de la insulina

en tejidos periféricos (Ozcan *et al.*, 2004; Panzhinskiy *et al.*, 2013) y en la disfunción de las células β pancreáticas (Volchuk y Ron, 2010). Si nos centramos en las células inmunitarias, varios trabajos han señalado un aumento del estrés de RE en leucocitos de pacientes con DM2 en comparación con sujetos sanos, que se asocia con un aumento de la apoptosis y una alteración de la función inmunitaria de estas células (Komura *et al.*, 2010; Lenin *et al.*, 2015; Rovira-Llopis *et al.*, 2014). Además, un trabajo previo de nuestro grupo demostró que, en leucocitos de pacientes con DM2, el patrón de expresión de marcadores implicados en el estrés de RE y la UPR varía en función del control glucémico del paciente; de hecho los leucocitos de pacientes con $HbA_{1C} < 7\%$ mostraron una respuesta adaptativa al estrés de RE con mayores niveles de *sXBP1*, mientras que en pacientes con $HbA_{1C} > 7\%$ el incremento de la expresión de ATF6 y CHOP sugirió una inclinación hacia una respuesta proapoptótica en condiciones de mal control glucémico (Rovira-Llopis *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta ahora nadie había estudiado si el tratamiento con metformina tiene algún efecto sobre el estrés de RE y la modulación de las diferentes vías de la UPR en leucocitos. Por este motivo, y tras haber observado beneficios a nivel de estrés oxidativo e interacciones leucocito-endotelio, decidimos estudiar si los leucocitos de pacientes tratados con metformina presentaban alguna diferencia en cuanto a la activación de las tres rutas de la UPR con respecto a los de pacientes no tratados con metformina. Este estudio fue llevado a cabo en una cohorte de controles y pacientes diabéticos diferente a la anterior, pero que compartía los mismos criterios de inclusión y exclusión. Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de GRP78 están aumentados en ambos grupos de pacientes diabéticos en comparación con los controles sanos, confirmando un aumento del estrés de RE en los leucocitos de pacientes con DM2. GRP78 es una chaperona molecular que participa en el correcto plegamiento de las proteínas sintetizadas en el RE. Tras la inducción de la UPR, la producción de GRP78 aumenta drásticamente como un mecanismo para aumentar la capacidad de plegamiento del RE (Kozutsumi *et al.*, 1988; Schroder y Kaufman, 2005). Curiosamente, cuando miramos la expresión de los principales mediadores de las tres rutas de la UPR, observamos patrones de expresión completamente diferentes en los pacientes tratados y no tratados con metformina. Así, los leucocitos de los pacientes no tratados con el fármaco expresaban mayores niveles de ATF6; mientras que los leucocitos de pacientes que tomaban metformina se inclinaban hacia una activación de las rutas de PERK e IRE1; como puede observarse por el aumento en los niveles de p-eIF2 α y de *s-XBP1*, sugiriendo que el tratamiento con metformina podría modular la UPR inhibiendo la ruta de señalización de ATF6 y promoviendo las de PERK e IRE1, relacionadas con una respuesta principalmente adaptativa. De acuerdo con este posible papel de la metformina, Quentin y colaboradores demostraron que la incubación de cardiomiocitos de rata con metformina promovía una activación de la ruta de

PERK sin inducción de la apoptosis; por el contrario, no observaron modificaciones estadísticamente significativas en la expresión génica de *Grp78*, *Atf6* y *s-Xbp1* en presencia de metformina (Quentin *et al.*, 2012).

El mantenimiento de la homeostasis redox en el RE parece ser fundamental para el correcto plegamiento de las proteínas (Ellgaard *et al.*, 2018; van der Vlies *et al.*, 2003). Durante el proceso de plegamiento, la formación de puentes disulfuro de las proteínas es catalizada por enzimas oxidoreductasas que utilizan O_2 como aceptor final de electrones, dejando como resultado un aumento en la producción de ERO que se intensifica cuando hay un aumento de proteínas mal plegadas que necesitan de la acción de estas chaperonas (Haynes *et al.*, 2004). Sin embargo, la relación del estrés de RE y estrés oxidativo es bidireccional y se ha observado que, en células β pancreáticas, el estrés oxidativo es responsable de la activación de marcadores de estrés de RE inducida por LDL oxidadas (Plaisance *et al.*, 2016). Además, la presencia de unos niveles adecuados de GSH es crucial en el manejo de las proteínas mal plegadas, ya que el GSH puede reaccionar y reducir puentes disulfuro no nativos permitiendo que las proteínas mal plegadas puedan ser replegadas correctamente (Chakravarthi y Bulleid, 2004). Por tanto, si los niveles de GSH están reducidos, el correcto plegamiento de las proteínas se vería comprometido y daría lugar a un aumento del estrés de RE. En la presente tesis hemos demostrado que los leucocitos de pacientes con DM2 presentan un descenso en los niveles intracelulares de GSH, que es más pronunciado en aquellos pacientes que no están en tratamiento con metformina. Esta disminución en los niveles de GSH podría explicar, al menos en parte, el aumento del estrés de RE en ambos grupos de pacientes diabéticos.

En los pacientes tratados con metformina, el aumento de los niveles proteicos de p-eIF2 α es indicativo de un aumento en la ruta de señalización mediada por PERK. Tras la disociación de GRP78, la actividad quinasa de PERK se activa y es capaz de fosforilar a sus proteínas diana, como eIF2 α y Nrf2. La fosforilación de Nrf2 permite que se separe de su inhibidor (KEAP1), lo que deja expuesta su secuencia de localización nuclear (Cullinan *et al.*, 2003); y una vez en el núcleo, Nrf2 promueve la expresión de genes que contienen elementos de respuesta antioxidantes en su promotor, dando lugar a un aumento en los niveles de una serie de enzimas antioxidantes (Cullinan y Diehl, 2006), entre las que se encuentra *SIRT3* (Satterstrom *et al.*, 2015). Por otro lado, la fosforilación de eIF2 α induce el factor de transcripción ATF4, que es responsable de la expresión de genes esenciales para la síntesis intracelular de GSH (Harding *et al.*, 2003). De acuerdo con nuestros resultados, la activación de la ruta de PERK en los leucocitos de pacientes tratados con metformina podría desencadenar el aumento en los niveles de GSH

intracelular, así como el incremento en los niveles de ARNm de *SIRT3*, en comparación con pacientes no tratados con este fármaco.

Aunque en nuestro trabajo, debido a limitaciones en la cantidad de muestras, no pudimos medir los niveles de CHOP en los tres grupos de pacientes, un estudio previo de este grupo mostró que, en una cohorte de pacientes con un mal control metabólico ($HbA_{1c} > 7\%$), el aumento de la expresión proteica de ATF6 en leucocitos coincidía con un incremento en los niveles de ARNm y proteína CHOP, sugiriendo un posible aumento de la respuesta proapoptótica en estas condiciones (Rovira-Llopis *et al.*, 2014). Estos resultados nos permiten proponer la hipótesis de si, en ausencia de tratamiento con metformina, el aumento crónico de la vía de la UPR mediada por ATF6 observado en los leucocitos de pacientes con DM2 sería incapaz de aliviar el estrés de RE y conduciría hacia una respuesta proapoptótica. Para corroborar esta hipótesis sería necesaria la realización de estudios adicionales.

Además de inducir la degradación de proteínas a través del sistema ERAD, por el que se ubiquitan las proteínas mal plegadas para su degradación en el proteasoma, el estrés de RE es capaz de activar la autofagia para la eliminación de agregados proteicos que son resistentes al sistema ERAD y que se acumulan en el lumen del RE (Houck *et al.*, 2014). Por otra parte, el mecanismo de autofagia se encarga de la degradación del propio RE cuando está dañado, y reduce su expansión una vez que el estrés se ha resuelto y el RE ha de volver a su tamaño original (Bernales *et al.*, 2007). La autofagia, por tanto, se encuentra conectada al estrés de RE y es un mecanismo fundamental para el control homeostático de este orgánulo y su correcto funcionamiento. De la misma manera, un aumento del estrés oxidativo puede inducir autofagia; en concreto, los ERO derivados de la mitocondria son considerados reguladores centrales de la autofagia (Scherz-Shouval y Elazar, 2011). En este sentido, se ha demostrado que una producción excesiva de ERO mitocondriales provoca daño en las mitocondrias y este estímulo desencadena la activación de la autofagia (mitofagia) para la eliminación y reciclaje de las mitocondrias dañadas (Wang *et al.*, 2012). Aunque en la DM2 la autofagia se ha propuesto como un mecanismo protector que responde a distintos tipos de estrés celular, bajo determinadas situaciones, la acumulación excesiva de vesículas autofágicas en las células β pancreáticas da lugar a muerte celular programada por autofagia (Masini *et al.*, 2009). Por lo tanto, la autofagia puede desempeñar un papel protector o dañino en función del contexto y la situación celular.

Con toda esta información, y tras haber demostrado diferencias en la producción de ERO mitocondriales y en el patrón de activación de la UPR en leucocitos de pacientes con DM2 en

función de si llevaban o no tratamiento con metformina, decidimos estudiar qué pasaba con la expresión de diferentes marcadores de autofagia en nuestras muestras de leucocitos. Curiosamente, observamos que tanto el ratio de la proteína LC3 II/I como los niveles de expresión génica de Beclina 1 (*BECN1*) y *ATG7* estaban significativamente aumentados en los leucocitos de pacientes no tratados con metformina, mientras que en los leucocitos de los pacientes que sí tomaban metformina estos niveles revertían hasta alcanzar valores similares a los observados en el grupo control. Un estudio previo de nuestro grupo de investigación demostró un aumento de los marcadores autofágicos LC3-II y Beclina 1 en leucocitos de pacientes con DM2 en comparación con controles sanos. Este aumento de la maquinaria autofágica ocurrió en paralelo a un aumento en los niveles de ERO en la célula y a una mayor expresión de proteínas implicadas en el estrés de RE (GRP78, p-eIF2 α y ATF6); por lo que se propuso que tanto la acumulación intracelular de ERO como el aumento del estrés de RE podrían estar implicados en la inducción de la autofagia en los leucocitos de pacientes con DM2 (Rovira-Llopis *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral van un paso más allá y parecen indicar que, en pacientes no tratados con metformina los leucocitos presentan un aumento de la autofagia que podría ser resultado de un incremento en la producción de O₂^{-•} mitocondrial y de una excesiva acumulación de proteínas mal plegadas (probablemente debido a que, bajo estas circunstancias, la activación de la ruta de la UPR dependiente de ATF6 es incapaz por sí sola de reducir el estrés de RE y promover una respuesta antioxidante). Por el contrario, nuestra hipótesis es que en los leucocitos de los pacientes tratados con metformina, el incremento de la actividad autofágica no sería necesario debido a que, gracias a la acción del fármaco, se produciría una disminución del estrés oxidativo y un control del estrés de RE a través de las vías de la UPR dependientes de IRE1 y PERK. Aunque será necesario continuar estudiando los mecanismos por los cuales, bajo estas circunstancias, el tratamiento con metformina es capaz de modular la expresión de los genes implicados en la UPR y la autofagia, existen trabajos que apoyan un papel de la metformina en la normalización de la autofagia cuando ésta se encuentra aumentada. Por ejemplo, Masini y colaboradores demostraron que en células β pancreáticas obtenidas de pacientes con DM2 existe una acumulación de vacuolas autofágicas, que también ocurre en células β procedentes de controles no diabéticos cuando son incubadas con ácidos grasos no esterificados. Sin embargo, el tratamiento de las células con metformina fue capaz de reducir la acumulación de vacuolas autofágicas en ambos casos (Masini *et al.*, 2009). Por último, en otro estudio llevado a cabo sobre células cancerosas de próstata se observó que la incubación con metformina revertía el aumento en la expresión de *BECN1* y LC3 inducido por el tratamiento con 2-deoxiglucosa (Ben Sahra *et al.*, 2010).

El estudio de los mecanismos moleculares a través de los que la metformina ejerce su acción es fundamental para conocer mejor sus efectos beneficiosos y sentar las bases para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

En conjunto, los resultados de la presente tesis doctoral muestran una implicación de los haplogrupos mitocondriales, el estrés oxidativo, la dinámica mitocondrial, la disfunción endotelial, el estrés de RE y la autofagia en la DM2; e indican que estos mecanismos moleculares conforman un complejo puzzle de fichas interconectadas que sientan las bases fisiopatológicas de la enfermedad y sus complicaciones asociadas. Además, hemos arrojado luz sobre los mecanismos por los que el tratamiento con metformina podría mejorar la función vascular de los pacientes con DM2 y modular la señalización celular en los leucocitos promoviendo una disminución de sus interacciones con el endotelio, y retrasando así el desarrollo del proceso aterosclerótico. Muchas son las vías y moléculas que participan en el daño acarreado por la DM2, y su conocimiento permite acercar la investigación básica a la práctica clínica, favoreciendo así el diseño de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad.

3. CONCLUSIONES

1. El haplogrupo JT del ADNmt (concretamente, el polimorfismo m.4216T>C) se asocia con un peor control glucémico en pacientes con DM2, que contribuiría al deterioro de su función renal y podría predisponer a los pacientes al desarrollo de nefropatía diabética.
2. El control glucémico inadecuado en los pacientes con DM2 se relaciona con una alteración en la expresión leucocitaria de las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial, así como con disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. En consecuencia, existe un aumento de la interacción leucocito-endotelio que podría acelerar el proceso aterosclerótico y, por tanto, el desarrollo de complicaciones vasculares.
3. Los pacientes con DM2 tratados con metformina presentan una menor concentración de moléculas de adhesión celular en suero y una reducción de los marcadores de estrés oxidativo en sus leucocitos, que se asocia a una disminución de las interacciones leucocito-endotelio. Por lo tanto, el papel protector de la metformina sobre las complicaciones vasculares podría estar mediado, en parte, a través de estos mecanismos.
4. El tratamiento con metformina modula el estrés oxidativo, la UPR y la autofagia en los leucocitos de pacientes con DM2. De forma que, en los leucocitos aislados de pacientes tratados con el fármaco, el descenso del estrés oxidativo, junto con un control del estrés de RE a través de las rutas de la UPR iniciadas por IRE1 y PERK, harían innecesario un incremento de la actividad autofágica. Por el contrario, en los leucocitos de pacientes no tratados con metformina, el aumento del estrés oxidativo y la activación de la vía de la UPR dependiente de ATF6, podrían aumentar la expresión de marcadores de autofagia con el fin de eliminar la excesiva acumulación de proteínas mal plegadas.

CONCLUSIONS

1. The mitochondrial DNA haplogroup JT (in particular, the polymorphism m.4216T>C) is associated with a worse management of glucose in type 2 diabetic (T2D) patients, which contributes to a deterioration of renal function and may predispose patients to the development of diabetic nephropathy.
2. Loss of glycaemic control in T2D patients is related to an imbalance in the expression of proteins involved in the mitochondrial dynamics of their leukocytes, which is accompanied by mitochondrial dysfunction and oxidative stress. As a result, leukocytes interact more frequently with the endothelium, thus accelerating the atherosclerotic process that can lead to the onset of vascular complications.
3. T2D patients under metformin treatment present improvements in serum levels of adhesion molecules, and a reduction in oxidative stress in their leukocytes, which may be mediated by an inhibition of mitochondrial ROS production, an increase in GSH levels, and enhanced mRNA expression of *GPX1* and *SIRT3*. Altogether, these beneficial effects of metformin may mediate a protective role against T2D-associated vascular complications by decreasing leukocyte-endothelium interactions in T2D patients.
4. Metformin treatment modulates oxidative stress, the UPR, and autophagy in the leukocytes of T2D patients. Thus, a reduction in oxidative stress, together with an increase in the UPR pathways initiated by IRE1 and PERK, may block autophagy from occurring in the leukocytes of metformin-treated patients. In contrast, in leukocytes of patients not treated with metformin, the increase in oxidative stress and the activation of the ATF6-dependent branch of UPR may enhance the expression of autophagy markers in order to clear misfolded proteins.

BIBLIOGRAFÍA

- Achilli, A., Olivieri, A., Pala, M., Hooshiar Kashani, B., Carossa, V., Perego, U.A., Gandini, F., Santoro, A., Battaglia, V., Grugni, V., *et al.* (2011). Mitochondrial DNA backgrounds might modulate diabetes complications rather than T2DM as a whole. *PLoS One* 6, e21029.
- Adler, A.I., Stratton, I.M., Neil, H.A., Yudkin, J.S., Matthews, D.R., Cull, C.A., Wright, A.D., Turner, R.C., and Holman, R.R. (2000). Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 321, 412-419.
- ADVANCE Collaborative Group, Patel, A., MacMahon, S., Chalmers, J., Neal, B., Billot, L., Woodward, M., Marre, M., Cooper, M., Glasziou, P., *et al.* (2008). Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 358, 2560-2572.
- Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X., and Finkel, T. (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14447-14452.
- American Diabetes Association. (2018a). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41, S13-S27.
- American Diabetes Association. (2018b). 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41, S55-S64.
- Andrews, M., Soto, N., and Arredondo, M. (2012). Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor-alpha, Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients. *Rev. Med. Chil.* 140, 1377-1382.
- 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. *Nat. Med.* 11, 191-198.
- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., *et al.* (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54, 2685-2693.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., *et al.* (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network

- architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* **278**, 17190-17197.
- Badimon, L., and Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* **276**, 618-632.
- Bailey, C.J., Campbell, I.W., Chan J.C.N., Davidson, J.A., Howlett H.C.S., Ritz, P., and editors. (2007). Mecanismos de protección vascular con metformina. In *Metformina, el tratamiento de referencia: Manual científico*, Wiley) pp. 141-158.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Balbi, M.E., Tonin, F.S., Mendes, A.M., Borba, H.H., Wiens, A., Fernandez-Llimos, F., and Pontarolo, R. (2018). Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetol. Metab. Syndr.* **10**, 18-018-0318-5. eCollection 2018.
- Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Lopez-Domenech, S., Diaz-Morales, N., Blas-Garcia, A., Veses, S., Morillas, C., Victor, V.M., Rocha, M., and Hernandez-Mijares, A. (2017). Oxidative and endoplasmic reticulum stress is impaired in leukocytes from metabolically unhealthy vs healthy obese individuals. *Int. J. Obes. (Lond)* **41**, 1556-1563.
- Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El-Mir, M.Y., Fontaine, E., Rigoulet, M., and Leverve, X.M. (2006). The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J. Bioenerg. Biomembr.* **38**, 33-42.
- Bause, A.S., and Haigis, M.C. (2013). SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **48**, 634-639.
- Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **287**, 2570-2581.
- Beckman, J.A., Paneni, F., Cosentino, F., and Creager, M.A. (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *Eur. Heart J.* **34**, 2444-2452.
- Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245-313.
- Bell, E.L., Emerling, B.M., Ricoult, S.J., and Guarente, L. (2011). SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene* **30**, 2986-2996.

- Ben Sahra, I., Tanti, J.F., and Bost, F. (2010). The combination of metformin and 2 deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy* 6, 670-671.
- Bernales, S., Schuck, S., and Walter, P. (2007). ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 3, 285-287.
- Bhansali, S., Bhansali, A., Walia, R., Saikia, U.N., and Dhawan, V. (2017). Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 8, 347.
- Bloch-Damti, A., and Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1553-1567.
- Bocca, C., Kane, M.S., Veyrat-Durebex, C., Chupin, S., Alban, J., Kouassi Nzougnet, J., Le Mao, M., Chao de la Barca, J.M., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., *et al.* (2018). The Metabolomic Bioenergetic Signature of Opa1-Disrupted Mouse Embryonic Fibroblasts Highlights Aspartate Deficiency. *Sci. Rep.* 8, 11528-018-29972-9.
- 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, 2438-2444.
- Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 6, 10.1101/cshperspect.a009191.
- Boulbou, M.S., Koukoulis, G.N., Makri, E.D., Petinaki, E.A., Gourgoulialis, K.I., and Germenis, A.E. (2005). Circulating adhesion molecules levels in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Int. J. Cardiol.* 98, 39-44.
- Boustany, C.M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D.R., Randall, D.C., and Cassis, L.A. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R943-9.
- Boyle, P.J. (2007). Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am. J. Med.* 120, S12-7.
- Bregman, J.A., Herren, D.J., Estopinal, C.B., Chocron, I.M., Harlow, P.A., Warden, C., Brantley, M.A., Jr, and Samuels, D.C. (2017). Mitochondrial Haplogroups Affect Severity But Not Prevalence of Diabetic Retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 1346-1351.

- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhausl, W., and Fornsinn, C. (2004). Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 53, 1052-1059.
- Bruno, G., Runzo, C., Cavallo-Perin, P., Merletti, F., Rivetti, M., Pinach, S., Novelli, G., Trovati, M., Cerutti, F., Pagano, G., and Piedmont Study Group for Diabetes Epidemiology. (2005). Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care* 28, 2613-2619.
- Buler, M., Aatsinki, S.M., Izzi, V., and Hakkola, J. (2012). Metformin reduces hepatic expression of SIRT3, the mitochondrial deacetylase controlling energy metabolism. *PLoS One* 7, e49863.
- 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. *Nat. Med.* 11, 183-190.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Leso, V., Trovato-Salinaro, A., Ventimiglia, B., Cavallaro, M., Scuto, M., Rizza, S., Zanolli, L., Neri, S., and Castellino, P. (2012). Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 729-736.
- Campello, S., Lacalle, R.A., Bettella, M., Manes, S., Scorrano, L., and Viola, A. (2006). Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J. Exp. Med.* 203, 2879-2886.
- Campello, S., and Scorrano, L. (2010). Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 11, 678-684.
- Carey, V.J., Walters, E.E., Colditz, G.A., Solomon, C.G., Willett, W.C., Rosner, B.A., Speizer, F.E., and Manson, J.E. (1997). Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 145, 614-619.
- Carnagarin, R., Dharmarajan, A.M., and Dass, C.R. (2015). Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle--A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 417, 52-62.

- Carrizzo, A., Izzo, C., Oliveti, M., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Di Pietro, P., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., *et al.* (2018). The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 10.3390/ijms19102968.
- Chait, A., Brazg, R.L., Tribble, D.L., and Krauss, R.M. (1993). Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am. J. Med.* *94*, 350-356.
- Chakravarthi, S., and Bulleid, N.J. (2004). Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 39872-39879.
- Chan, S.M., Sun, R.Q., Zeng, X.Y., Choong, Z.H., Wang, H., Watt, M.J., and Ye, J.M. (2013). Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* *62*, 2095-2105.
- Chartoumpekis, D.V., and Kensler, T.W. (2013). New player on an old field; the keap1/Nrf2 pathway as a target for treatment of type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Curr. Diabetes Rev.* *9*, 137-145.
- Chatterjee, S., Khunti, K., and Davies, M.J. (2017). Type 2 diabetes. *Lancet* *389*, 2239-2251.
- Chawla, A., Chawla, R., and Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian. J. Endocrinol. Metab.* *20*, 546-551.
- Chen, G., McAlister, F.A., Walker, R.L., Hemmelgarn, B.R., and Campbell, N.R. (2011). Cardiovascular outcomes in framingham participants with diabetes: the importance of blood pressure. *Hypertension* *57*, 891-897.
- Chicco, A.J., and Sparagna, G.C. (2007). Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* *292*, C33-44.
- Chinnery, P.F., Mowbray, C., Patel, S.K., Elson, J.L., Sampson, M., Hitman, G.A., McCarthy, M.I., Hattersley, A.T., and Walker, M. (2007). Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: a study of 897 cases and 1010 controls. *J. Med. Genet.* *44*, e80.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* *292*, 1728-1731.

- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., and Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *138*, 271-281.
- Choi, S.H., and Ginsberg, H.N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* *22*, 353-363.
- Cinar, M.G., Ulker, S., Alper, G., and Evinc, A. (2001). Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology* *62*, 56-64.
- Cnop, M., Vidal, J., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Schraw, T., Scherer, P.E., Boyko, E.J., Fujimoto, W.Y., and Kahn, S.E. (2007). Progressive loss of beta-cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* *30*, 677-682.
- Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* *9*, 191-200.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., *et al.* (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* *155*, 160-171.
- Crispim, D., Canani, L.H., Gross, J.L., Tschiedel, B., Souto, K.E., and Roisenberg, I. (2006). The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: an analysis of the m.4216T > C and m.4917A > G variants. *Ann. Hum. Genet.* *70*, 488-495.
- Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 25409-25412.
- Cullinan, S.B., and Diehl, J.A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 317-332.
- 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. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7198-7209.
- da Luz, G., Frederico, M.J., da Silva, S., Vitto, M.F., Cesconetto, P.A., de Pinho, R.A., Pauli, J.R., Silva, A.S., Cintra, D.E., Ropelle, E.R., and De Souza, C.T. (2011). Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* *111*, 2015-2023.

- Dahmany, Y., Marcuello, A., Montiel-Sosa, F., Martínez-Redondo, D., Montoya, J., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M., and Ruiz-Pesini, E. (2006). Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72, 37-47.
- Dalla Vestra, M., Mussap, M., Gallina, P., Bruseghin, M., Cernigoi, A.M., Saller, A., Plebani, M., and Fioretto, P. (2005). Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 *Suppl 1*, S78-82.
- Dandona, P., Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Assian, E., and Ahmad, S. (2001). Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3257-3265.
- Dandona, P., Chaudhuri, A., Ghanim, H., and Mohanty, P. (2009). Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, S14-20.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.
- de Jager, J., Kooy, A., Schalkwijk, C., van der Kolk, J., Lehert, P., Bets, D., Wulffele, M.G., Donker, A.J., and Stehouwer, C.D. (2014). Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J. Intern. Med.* 275, 59-70.
- DeFronzo, R.A. (2004). Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* (143), 9-21.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R.R., Herman, W.H., Holst, J.J., Hu, F.B., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G.I., *et al.* (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15019.
- Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1998). Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* 44, 1139-1145.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217-3266.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007a). Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* 176, 405-414.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007b). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 870-879.

- Dhananjayan, R., Koundinya, K.S., Malati, T., and Kutala, V.K. (2016). Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian. J. Clin. Biochem.* *31*, 372-379.
- Diabetes Prevention Program Research Group, Knowler, W.C., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Christophi, C.A., Hoffman, H.J., Brenneman, A.T., Brown-Friday, J.O., Goldberg, R., Venditti, E., and Nathan, D.M. (2009). 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet* *374*, 1677-1686.
- Dichtl, W., Nilsson, L., Goncalves, I., Ares, M.P., Banfi, C., Calara, F., Hamsten, A., Eriksson, P., and Nilsson, J. (1999). Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ. Res.* *84*, 1085-1094.
- Do, R., Willer, C.J., Schmidt, E.M., Sengupta, S., Gao, C., Peloso, G.M., Gustafsson, S., Kanoni, S., Ganna, A., Chen, J., *et al.* (2013). Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat. Genet.* *45*, 1345-1352.
- Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 98-107.
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* *103*, 253-259.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., and Dufer, M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch.* *460*, 703-718.
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., *et al.* (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell. Metab.* *8*, 325-332.
- Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M.T., and Palmer, C.S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 150-161.
- Ellgaard, L., Sevier, C.S., and Bulleid, N.J. (2018). How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum? *Trends Biochem. Sci.* *43*, 32-43.
- Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Pennells, L., Wood, A.M., White, I.R., Gao, P., Walker, M., Thompson, A., Sarwar, N., *et al.* (2012). C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1310-1320.

- Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar, N., Gao, P., Seshasai, S.R., Gobin, R., Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Ingelsson, E., Lawlor, D.A., Selvin, E., *et al.* (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375, 2215-2222.
- Eriksson, J.W. (2007). Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett.* 581, 3734-3742.
- Escribano-Lopez, I., Diaz-Morales, N., Rovira-Llopis, S., de Maranon, A.M., Orden, S., Alvarez, A., Bañuls, C., Rocha, M., Murphy, M.P., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. (2016). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biol.* 10, 200-205.
- Eskelinen, E.L., and Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 664-673.
- Feder, J., Ovadia, O., Blech, I., Cohen, J., Wainstein, J., Harman-Boehm, I., Glaser, B., and Mishmar, D. (2009). Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Med. Genet.* 10, 60-2350-10-60.
- Fleming, I., and Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1-12.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., and Scorrano, L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177-189.
- Fujimoto, K., Hanson, P.T., Tran, H., Ford, E.L., Han, Z., Johnson, J.D., Schmidt, R.E., Green, K.G., Wice, B.M., and Polonsky, K.S. (2009). Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation. *J. Biol. Chem.* 284, 27664-27673.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583-1606.
- Fuku, N., Park, K.S., Yamada, Y., Nishigaki, Y., Cho, Y.M., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., Kato, K., Yokoi, K., *et al.* (2007). Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 407-415.
- Garber, A.J., Abrahamson, M.J., Barzilay, J.I., Blonde, L., Bloomgarden, Z.T., Bush, M.A., Dagogo-Jack, S., DeFronzo, R.A., Einhorn, D., Fonseca, V.A., *et al.* (2018). Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on

- the Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm - 2018 Executive Summary. *Endocr. Pract.* *24*, 91-120.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* *388*, 1545-1602.
- Gheith, O., Farouk, N., Nampoory, N., Halim, M.A., and Al-Otaibi, T. (2015). Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J. Nephroarmacol* *5*, 49-56.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* *107*, 1058-1070.
- Goldberg, H., Whiteside, C., and Fantus, I.G. (2011). O-linked beta-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *301*, E713-26.
- Goldberg, R., Temprosa, M., Otvos, J., Brunzell, J., Marcovina, S., Mather, K., Arakaki, R., Watson, K., Horton, E., and Barrett-Connor, E. (2013). Lifestyle and metformin treatment favorably influence lipoprotein subfraction distribution in the Diabetes Prevention Program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 3989-3998.
- Goldstein, B.J., Ahmad, F., Ding, W., Li, P.M., and Zhang, W.R. (1998). Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biochem.* *182*, 91-99.
- Greene, M.W., Sakaue, H., Wang, L., Alessi, D.R., and Roth, R.A. (2003). Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *278*, 8199-8211.
- Gregg, E.W., Sattar, N., and Ali, M.K. (2016). The changing face of diabetes complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *4*, 537-547.
- 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*, 693-700.
- Haas, M.E., Attie, A.D., and Biddinger, S.B. (2013). The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 391-397.

- Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., *et al.* (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* *15*, 481-490.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., *et al.* (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* *11*, 619-633.
- Hattori, Y., Suzuki, K., Hattori, S., and Kasai, K. (2006). Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* *47*, 1183-1188.
- Haynes, C.M., Titus, E.A., and Cooper, A.A. (2004). Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell* *15*, 767-776.
- He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., *et al.* (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* *481*, 511-515.
- Herder, C., Illig, T., Rathmann, W., Martin, S., Haastert, B., Muller-Scholze, S., Holle, R., Thorand, B., Koenig, W., Wichmann, H.E., Kolb, H., and KORA Study Group. (2005). Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen* *67 Suppl 1*, S115-21.
- 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 Radic. Biol. Med.* *50*, 1215-1221.
- 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, V.M. (2013). Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* *36*, 1695-1702.
- Herrnstadt, C., Elson, J.L., Fahy, E., Preston, G., Turnbull, D.M., Anderson, C., Ghosh, S.S., Olefsky, J.M., Beal, M.F., Davis, R.E., and Howell, N. (2002). Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 1152-1171.
- Hirschey, M.D., Shimazu, T., Huang, J.Y., Schwer, B., and Verdin, E. (2011a). SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *76*, 267-277.

- Hirschey, M.D., Shimazu, T., Jing, E., Grueter, C.A., Collins, A.M., Aouizerat, B., Stancakova, A., Goetzman, E., Lam, M.M., Schwer, B., *et al.* (2011b). SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol. Cell* 44, 177-190.
- Holman, N., Young, B., and Gadsby, R. (2015). Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet. Med.* 32, 1119-1120.
- Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel, M.A., Matthews, D.R., and Neil, H.A. (2008). 10-Year Follow-Up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 359, 1577-1589.
- Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140, 900-917.
- Hotamisligil, G.S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 Suppl 3, S53-5.
- Hou, W.L., Yin, J., Alimujiang, M., Yu, X.Y., Ai, L.G., Bao, Y.Q., Liu, F., and Jia, W.P. (2018). Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 1316-1328.
- Houck, S.A., Ren, H.Y., Madden, V.J., Bonner, J.N., Conlin, M.P., Janovick, J.A., Conn, P.M., and Cyr, D.M. (2014). Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR. *Mol. Cell* 54, 166-179.
- Hoyer-Hansen, M., and Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 14, 1576-1582.
- Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., and Willett, W.C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med.* 345, 790-797.
- Hwang, N.R., Yim, S.H., Kim, Y.M., Jeong, J., Song, E.J., Lee, Y., Lee, J.H., Choi, S., and Lee, K.J. (2009). Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem. J.* 423, 253-264.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.

- Ivanova, E.A., Myasoedova, V.A., Melnichenko, A.A., Grechko, A.V., and Orekhov, A.N. (2017). Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med. Cell. Longev* 2017, 1273042.
- Jackson, M.J., Papa, S., Bolanos, J., Bruckdorfer, R., Carlsen, H., Elliott, R.M., Flier, J., Griffiths, H.R., Heales, S., Holst, B., *et al.* (2002). Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol. Aspects Med.* 23, 209-285.
- Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2007). Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241-251.
- Jain, R.K., Munn, L.L., and Fukumura, D. (2013). Measuring leukocyte-endothelial interactions in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013, 561-563.
- Jain, S.K. (1989). Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 264, 21340-21345.
- Jain, S.K., Levine, S.N., Duett, J., and Hollier, B. (1990). Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 39, 971-975.
- Jain, S.K., McVie, R., Duett, J., and Herbst, J.J. (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 38, 1539-1543.
- Jheng, H.F., Tsai, P.J., Guo, S.M., Kuo, L.H., Chang, C.S., Su, I.J., Chang, C.R., and Tsai, Y.S. (2012). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 32, 309-319.
- Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287-1295.
- 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., *et al.* (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell. Metab.* 8, 318-324.
- Kaiser, N., Sasson, S., Feener, E.P., Boukobza-Vardi, N., Higashi, S., Moller, D.E., Davidheiser, S., Przybylski, R.J., and King, G.L. (1993). Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 42, 80-89.
- 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, 930-939.

- Kaur, R., Kaur, M., and Singh, J. (2018). Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc. Diabetol.* *17*, 121-018-0763-3.
- Kearney, K., Tomlinson, D., Smith, K., and Ajjan, R. (2017). Hypofibrinolysis in diabetes: a therapeutic target for the reduction of cardiovascular risk. *Cardiovasc. Diabetol.* *16*, 34-017-0515-9.
- Kedziora-Kornatowska, K., Szram, S., Kornatowski, T., Szadujkis-Szadurski, L., Kedziora, J., and Bartosz, G. (2003). Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron Exp. Nephrol.* *95*, e134-43.
- 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*, 2944-2950.
- Khanam, P.A., Hoque, S., Begum, T., Habib, S.H., and Latif, Z.A. (2017). Microvascular complications and their associated risk factors in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Syndr.* *11 Suppl 2*, S577-S581.
- Kim, I., Xu, W., and Reed, J.C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 1013-1030.
- Kim, J.A., Montagnani, M., Koh, K.K., and Quon, M.J. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* *113*, 1888-1904.
- Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W., and Kasuga, M. (1999). Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6286-6296.
- Kofler, B., Mueller, E.E., Eder, W., Stanger, O., Maier, R., Weger, M., Haas, A., Winker, R., Schmut, O., Paulweber, B., *et al.* (2009). Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med. Genet.* *10*, 35-2350-10-35.
- 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*, 634-643.

- Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., Fang, F., and Chang, Y. (2010). Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One* 5, e11707.
- Kooy, A., de Jager, J., Lehert, P., Bets, D., Wulffele, M.G., Donker, A.J., and Stehouwer, C.D. (2009). Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 169, 616-625.
- Koska, J., Saremi, A., Howell, S., Bahn, G., De Courten, B., Ginsberg, H., Beisswenger, P.J., Reaven, P.D., and VADT Investigators. (2018). Advanced Glycation End Products, Oxidation Products, and Incident Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 41, 570-576.
- Kowaltowski, A.J., and Vercesi, A.E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 463-471.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.
- Krogh-Madsen, R., Plomgaard, P., Moller, K., Mittendorfer, B., and Pedersen, B.K. (2006). Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E108-14.
- Kulkarni, H., Mamtani, M., Peralta, J., Almeida, M., Dyer, T.D., Goring, H.H., Johnson, M.P., Duggirala, R., Mahaney, M.C., Olvera, R.L., *et al.* (2016). Soluble Forms of Intercellular and Vascular Cell Adhesion Molecules Independently Predict Progression to Type 2 Diabetes in Mexican American Families. *PLoS One* 11, e0151177.
- Kwak, S.H., and Park, K.S. (2016). Role of mitochondrial DNA variation in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 21, 1151-1167.
- Lam, A.K., and Galione, A. (2013). The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2542-2559.
- Langer, H.F., and Chavakis, T. (2009). Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1211-1220.
- Lecube, A., Monereo, S., Rubio, M.A., Martinez-de-Icaya, P., Marti, A., Salvador, J., Masmiquel, L., Goday, A., Bellido, D., Lurbe, E., *et al.* (2017). Prevention, diagnosis, and treatment of

- obesity. 2016 position statement of the Spanish Society for the Study of Obesity. *Endocrinol. Diabetes Nutr. 64 Suppl 1*, 15-22.
- Lee, H.K., Song, J.H., Shin, C.S., Park, D.J., Park, K.S., Lee, K.U., and Koh, C.S. (1998). Decreased mitochondrial DNA content in peripheral blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **42**, 161-167.
- Lee, J., and Ozcan, U. (2014). Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J. Biol. Chem.* **289**, 1203-1211.
- Lee, M.W., Chanda, D., Yang, J., Oh, H., Kim, S.S., Yoon, Y.S., Hong, S., Park, K.G., Lee, I.K., Choi, C.S., *et al.* (2010). Regulation of hepatic gluconeogenesis by an ER-bound transcription factor, CREBH. *Cell. Metab.* **11**, 331-339.
- Lee, Y.K., and Lee, J.A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* **49**, 424-430.
- Leeuwenberg, J.F., Smeets, E.F., Neefjes, J.J., Shaffer, M.A., Cinek, T., Jeunhomme, T.M., Ahern, T.J., and Buurman, W.A. (1992). E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* **77**, 543-549.
- Lenin, R., Sankaramoorthy, A., Mohan, V., and Balasubramanyam, M. (2015). Altered immunometabolism at the interface of increased endoplasmic reticulum (ER) stress in patients with type 2 diabetes. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 615-622.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., and Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 463-466.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678-689.
- Ling, X., Ye, J.F., and Zheng, X.X. (2003). Dynamic investigation of leukocyte-endothelial cell adhesion interaction under fluid shear stress in vitro. *Sheng Wu Hua. Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**, 567-572.
- Liou, C.W., Chen, J.B., Tiao, M.M., Weng, S.W., Huang, T.L., Chuang, J.H., Chen, S.D., Chuang, Y.C., Lee, W.C., Lin, T.K., and Wang, P.W. (2012). Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes. *Diabetes* **61**, 2642-2651.

- Litwak, L., Goh, S.Y., Hussein, Z., Malek, R., Prusty, V., and Khamseh, M.E. (2013). Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A1chieve study. *Diabetol. Metab. Syndr.* 5, 57-5996-5-57.
- Liu, M.Y., Jin, J., Li, S.L., Yan, J., Zhen, C.L., Gao, J.L., Zhang, Y.H., Zhang, Y.Q., Shen, X., Zhang, L.S., *et al.* (2016). Mitochondrial Fission of Smooth Muscle Cells Is Involved in Artery Constriction. *Hypertension* 68, 1245-1254.
- Lo, M.C., Chen, M.H., Lee, W.S., Lu, C.I., Chang, C.R., Kao, S.H., and Lee, H.M. (2015). Nepsilon-(carboxymethyl) lysine-induced mitochondrial fission and mitophagy cause decreased insulin secretion from beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309, E829-39.
- Lopez-Domenech, S., Abad-Jimenez, Z., Iannantuoni, F., de Maranon, A.M., Rovira-Llopis, S., Morillas, C., Bañuls, C., Victor, V.M., and Rocha, M. (2018a). Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity. *Mol. Metab.*
- Lopez-Domenech, S., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Escribano-Lopez, I., Morillas, C., Veses, S., Orden, S., Alvarez, A., Victor, V.M., Hernandez-Mijares, A., and Rocha, M. (2018b). Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12985.
- Loson, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* 24, 659-667.
- 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, 1115-1123.
- Lutchmansingh, F.K., Hsu, J.W., Bennett, F.I., Badaloo, A.V., McFarlane-Anderson, N., Gordon-Strachan, G.M., Wright-Pascoe, R.A., Jahoor, F., and Boyne, M.S. (2018). Glutathione metabolism in type 2 diabetes and its relationship with microvascular complications and glycemia. *PLoS One* 13, e0198626.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., and Donath, M.Y. (2002). Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 110, 851-860.

- Makino, A., Scott, B.T., and Dillmann, W.H. (2010). Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 53, 1783-1794.
- Malave, H., Castro, M., Burkle, J., Voros, S., Dayspring, T., Honigberg, R., and Pourfarzib, R. (2012). Evaluation of low-density lipoprotein particle number distribution in patients with type 2 diabetes mellitus with low-density lipoprotein cholesterol <50 mg/dl and non-high-density lipoprotein cholesterol <80 mg/dl. *Am. J. Cardiol.* 110, 662-665.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 716-731.
- Manea, S.A., Constantin, A., Manda, G., Sasson, S., and Manea, A. (2015). Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox Biol.* 5, 358-366.
- Martikainen, M.H., Ronnema, T., and Majamaa, K. (2015). Association of mitochondrial DNA haplogroups and vascular complications of diabetes mellitus: A population-based study. *Diab Vasc. Dis. Res.* 12, 302-304.
- 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, 1083-1086.
- Mather, K.J., Verma, S., and Anderson, T.J. (2001). Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37, 1344-1350.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* 11, 385-396.
- McLarty, J.L., Marsh, S.A., and Chatham, J.C. (2013). Post-translational protein modification by O-linked N-acetyl-glucosamine: its role in mediating the adverse effects of diabetes on the heart. *Life Sci.* 92, 621-627.
- Men, X., Wang, H., Li, M., Cai, H., Xu, S., Zhang, W., Xu, Y., Ye, L., Yang, W., Wollheim, C.B., and Lou, J. (2009). Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 879-890.
- Miki, A., Ricordi, C., Sakuma, Y., Yamamoto, T., Misawa, R., Mita, A., Molano, R.D., Vaziri, N.D., Pileggi, A., and Ichii, H. (2018). Divergent antioxidant capacity of human islet cell subsets: A

- potential cause of beta-cell vulnerability in diabetes and islet transplantation. *PLoS One* *13*, e0196570.
- Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., and Birnbaum, M.J. (2013). Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* *494*, 256-260.
- Millet, A.M., Bertholet, A.M., Daloyau, M., Reynier, P., Galinier, A., Devin, A., Wissinguer, B., Belenguer, P., and Davezac, N. (2016). Loss of functional OPA1 unbalances redox state: implications in dominant optic atrophy pathogenesis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *3*, 408-421.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., *et al.* (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 171-176.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1126-1167.
- Mohlke, K.L., Jackson, A.U., Scott, L.J., Peck, E.C., Suh, Y.D., Chines, P.S., Watanabe, R.M., Buchanan, T.A., Conneely, K.N., Erdos, M.R., *et al.* (2005). Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Hum. Genet.* *118*, 245-254.
- Molina, A.J., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., and Shirihai, O.S. (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* *58*, 2303-2315.
- Molitch, M.E., DeFronzo, R.A., Franz, M.J., Keane, W.F., Mogensen, C.E., Parving, H.H., Steffes, M.W., and American Diabetes Association. (2004). Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* *27 Suppl 1*, S79-83.
- Morris, A.P., Voight, B.F., Teslovich, T.M., Ferreira, T., Segre, A.V., Steinthorsdottir, V., Strawbridge, R.J., Khan, H., Grallert, H., Mahajan, A., *et al.* (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* *44*, 981-990.
- Mu, L., Zhao, Y., Lai, Y., Li, R., and Qiao, J. (2018). Insulin resistance and beta-cell dysfunction and the relationship with cardio-metabolic disorders among women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*
- Muller, W.A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet. Pathol.* *50*, 7-22.

- Muniyappa, R., and Quon, M.J. (2007). Insulin action and insulin resistance in vascular endothelium. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10, 523-530.
- Muñoz, J.P., Ivanova, S., Sanchez-Wandelmer, J., Martinez-Cristobal, P., Noguera, E., Sancho, A., Diaz-Ramos, A., Hernandez-Alvarez, M.I., Sebastian, D., Mauvezin, C., Palacin, M., and Zorzano, A. (2013). Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J.* 32, 2348-2361.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13.
- Musatov, A., and Robinson, N.C. (2012). Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic. Res.* 46, 1313-1326.
- Nathan, D.M., Turgeon, H., and Regan, S. (2007). Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia* 50, 2239-2244.
- Ngoh, G.A., Papanicolaou, K.N., and Walsh, K. (2012). Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 287, 20321-20332.
- Niu, Q., Zhang, W., Wang, H., Guan, X., Lu, J., and Li, W. (2015). Effects of mitochondrial haplogroup N9a on type 2 diabetes mellitus and its associated complications. *Exp. Ther. Med.* 10, 1918-1924.
- Niyazov, D.M., Kahler, S.G., and Frye, R.E. (2016). Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol. Syndromol* 7, 122-137.
- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J.M., Boeke, J.D., and Feinberg, A.P. (2002). SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13653-13658.
- Osowski, C.M., Hara, T., O'Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., Ishigaki, S., Zhu, L.J., Hayashi, E., Hui, S.T., *et al.* (2012). Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell. Metab.* 16, 265-273.
- Ost, A., Svensson, K., Ruishalme, I., Brannmark, C., Franck, N., Krook, H., Sandstrom, P., Kjolhede, P., and Stralfors, P. (2010). Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol. Med.* 16, 235-246.

- Owen, M.R., Doran, E., and Halestrap, A.P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* *348 Pt 3*, 607-614.
- Ozawa, T. (1997). Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. *Biosci. Rep.* *17*, 237-250.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* *306*, 457-461.
- Panzhinskiy, E., Hua, Y., Culver, B., Ren, J., and Nair, S. (2013). Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes. *Diabetologia* *56*, 598-607.
- Park, J.Y., Takahara, N., Gabriele, A., Chou, E., Naruse, K., Suzuma, K., Yamauchi, T., Ha, S.W., Meier, M., Rhodes, C.J., and King, G.L. (2000). Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* *49*, 1239-1248.
- Patti, M.E., and Corvera, S. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* *31*, 364-395.
- Pavlou, D.I., Paschou, S.A., Anagnostis, P., Spartalis, M., Spartalis, E., Vryonidou, A., Tentolouris, N., and Siasos, G. (2018). Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. *Maturitas* *112*, 71-77.
- Pavlovic, D., Kocic, R., Kocic, G., Jevtovic, T., Radenkovic, S., Mikic, D., Stojanovic, M., and Djordjevic, P.B. (2000). Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* *2*, 251-256.
- Pello, R., Martin, M.A., Carelli, V., Nijtmans, L.G., Achilli, A., Pala, M., Torroni, A., Gomez-Duran, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., *et al.* (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 4001-4011.
- Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 143-156.
- Petrie, J.R., Guzik, T.J., and Touyz, R.M. (2018). Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can. J. Cardiol.* *34*, 575-584.

- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1405-1415.
- Pickup, J.C. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* *27*, 813-823.
- 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*, 1286-1292.
- Piecznik, S.R., and Neustadt, J. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp. Mol. Pathol.* *83*, 84-92.
- Plaisance, V., Brajkovic, S., Tenenbaum, M., Favre, D., Ezanno, H., Bonnefond, A., Bonner, C., Gmyr, V., Kerr-Conte, J., Gauthier, B.R., *et al.* (2016). Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL. *PLoS One* *11*, e0163046.
- Proud, C.G., Wang, X., Patel, J.V., Campbell, L.E., Kleijn, M., Li, W., and Browne, G.J. (2001). Interplay between insulin and nutrients in the regulation of translation factors. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 541-547.
- Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M.D., Verdin, E., and Chen, D. (2010). Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell. Metab.* *12*, 662-667.
- 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., *et al.* (2012). Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* *55*, 392-403.
- Quentin, T., Steinmetz, M., Poppe, A., and Thoms, S. (2012). Metformin differentially activates ER stress signaling pathways without inducing apoptosis. *Dis. Model. Mech.* *5*, 259-269.
- Rains, J.L., and Jain, S.K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* *50*, 567-575.
- Rajapakse, A.G., Ming, X.F., Carvas, J.M., and Yang, Z. (2009). O-linked beta-N-acetylglucosamine during hyperglycemia exerts both anti-inflammatory and pro-oxidative properties in the endothelial system. *Oxid Med. Cell. Longev* *2*, 172-175.

- Reardon, W., Ross, R.J., Sweeney, M.G., Luxon, L.M., Pembrey, M.E., Harding, A.E., and Trembath, R.C. (1992). Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* *340*, 1376-1379.
- Reiling, E., Ling, C., Uitterlinden, A.G., Van't Riet, E., Welschen, L.M., Ladenvall, C., Almgren, P., Lyssenko, V., Nijpels, G., van Hove, E.C., *et al.* (2010). The association of mitochondrial content with prevalent and incident type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 1909-1915.
- Reinhardt, F., Schultz, J., Waterstradt, R., and Baltrusch, S. (2016). Drp1 guarding of the mitochondrial network is important for glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *474*, 646-651.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* *279*, 42351-42354.
- Roden, M., and Bernroider, E. (2003). Hepatic glucose metabolism in humans--its role in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *17*, 365-383.
- Roder, P.V., Wu, B., Liu, Y., and Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* *48*, e219.
- Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* *278*, 45777-45784.
- Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Apostolova, N., Morillas, C., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., and Victor, V.M. (2014). Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 1759-1765.
- Rovira-Llopis, S., Diaz-Morales, N., Bañuls, C., Blas-Garcia, A., Polo, M., Lopez-Domenech, S., Jover, A., Rocha, M., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. (2015). Is Autophagy Altered in the Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid. Redox Signal.* *23*, 1050-1056.
- Rovira-Llopis, S., Rocha, M., Falcon, R., de Pablo, C., Alvarez, A., Jover, A., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. (2013). Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 1452-1458.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V., and Wallace, D.C. (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* *303*, 223-226.

- Ruta, L.M., Magliano, D.J., Lemesurier, R., Taylor, H.R., Zimmet, P.Z., and Shaw, J.E. (2013). Prevalence of diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in developing and developed countries. *Diabet. Med.* *30*, 387-398.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* *322*, 1539-1543.
- Saijo, K., Mecklenbrauker, I., Santana, A., Leitger, M., Schmedt, C., and Tarakhovsky, A. (2002). Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J. Exp. Med.* *195*, 1647-1652.
- Salpeter, S.R., Buckley, N.S., Kahn, J.A., and Salpeter, E.E. (2008). Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am. J. Med.* *121*, 149-157.e2.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* *414*, 799-806.
- Salvado, L., Palomer, X., Barroso, E., and Vazquez-Carrera, M. (2015). Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 438-448.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* *126*, 12-22.
- Santillo, M., Colantuoni, A., Mondola, P., Guida, B., and Damiano, S. (2015). NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Front. Physiol.* *6*, 194.
- Sarparanta, J., Garcia-Macia, M., and Singh, R. (2017). Autophagy and Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* *13*, 352-369.
- Satterstrom, F.K., Swindell, W.R., Laurent, G., Vyas, S., Bulyk, M.L., and Haigis, M.C. (2015). Nuclear respiratory factor 2 induces SIRT3 expression. *Aging Cell.* *14*, 818-825.
- Saxena, R., de Bakker, P.I., Singer, K., Mootha, V., Burt, N., Hirschhorn, J.N., Gaudet, D., Isomaa, B., Daly, M.J., Groop, L., Ardlie, K.G., and Altshuler, D. (2006). Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 54-61.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 37861-37867.

- Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55, 1537-1545.
- Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 36, 30-38.
- Schleicher, E.D., and Weigert, C. (2000). Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* 77, S13-8.
- Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 64, 1403-1415.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739-789.
- Schultz, J., Waterstradt, R., Kantowski, T., Rickmann, A., Reinhardt, F., Sharoyko, V., Mulder, H., Tiedge, M., and Baltrusch, S. (2016). Precise expression of Fis1 is important for glucose responsiveness of beta cells. *J. Endocrinol.* 230, 81-91.
- Sears, B., and Perry, M. (2015). The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health. Dis.* 14, 121-015-0123-1.
- Sebastian, D., Hernandez-Alvarez, M.I., Segales, J., Sorianello, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., *et al.* (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5523-5528.
- Segal, A.W., and Jones, O.T. (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276, 515-517.
- Selvin, E., Bolen, S., Yeh, H.C., Wiley, C., Wilson, L.M., Marinopoulos, S.S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, R., Bass, E.B., and Brancati, F.L. (2008). Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* 168, 2070-2080.
- Shang, F., Zhang, J., Li, Z., Zhang, J., Yin, Y., Wang, Y., Marin, T.L., Gongol, B., Xiao, H., Zhang, Y.Y., *et al.* (2016). Cardiovascular Protective Effect of Metformin and Telmisartan: Reduction of PARP1 Activity via the AMPK-PARP1 Cascade. *PLoS One* 11, e0151845.
- 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., *et al.* (2011). Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124, 444-453.

- Shin, C.S., Moon, B.S., Park, K.S., Kim, S.Y., Park, S.J., Chung, M.H., and Lee, H.K. (2001). Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 24, 733-737.
- Shiny, A., Bibin, Y.S., Shanthirani, C.S., Regin, B.S., Anjana, R.M., Balasubramanyam, M., Jebarani, S., and Mohan, V. (2014). Association of neutrophil-lymphocyte ratio with glucose intolerance: an indicator of systemic inflammation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 16, 524-530.
- Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793-1801.
- Shurtz-Swirski, R., Sela, S., Herskovits, A.T., Shasha, S.M., Shapiro, G., Nasser, L., and Kristal, B. (2001). Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 24, 104-110.
- Singh, D.K., Winocour, P., and Farrington, K. (2011). Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 176-184.
- Singh, R., Hattersley, A.T., and Harries, L.W. (2007). Reduced peripheral blood mitochondrial DNA content is not a risk factor for Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 24, 784-787.
- Singh, R., Xiang, Y., Wang, Y., Baikati, K., Cuervo, A.M., Luu, Y.K., Tang, Y., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3329-3339.
- Skulachev, V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26, 23-29.
- Smulyan, H., Lieber, A., and Safar, M.E. (2016). Hypertension, Diabetes Type II, and Their Association: Role of Arterial Stiffness. *Am. J. Hypertens.* 29, 5-13.
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M., and Prolla, T.A. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143, 802-812.
- Song, J., Oh, J.Y., Sung, Y.A., Pak, Y.K., Park, K.S., and Lee, H.K. (2001). Peripheral blood mitochondrial DNA content is related to insulin sensitivity in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 24, 865-869.
- Soriano, F.G., Pacher, P., Mabley, J., Liaudet, L., and Szabo, C. (2001). Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ. Res.* 89, 684-691.

- Sowers, J.R. (2013). Diabetes mellitus and vascular disease. *Hypertension* 61, 943-947.
- Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A.F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52, 812-817.
- 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, 405-412.
- Su, J.B. (2015). Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J. Cardiol.* 7, 719-741.
- Summers, S.A., Kao, A.W., Kohn, A.D., Backus, G.S., Roth, R.A., Pessin, J.E., and Birnbaum, M.J. (1999). The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 17934-17940.
- Sun, Q., Li, J., and Gao, F. (2014). New insights into insulin: The anti-inflammatory effect and its clinical relevance. *World J. Diabetes* 5, 89-96.
- Sundaresan, N.R., Gupta, M., Kim, G., Rajamohan, S.B., Isbatan, A., and Gupta, M.P. (2009). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2758-2771.
- Surmi, B.K., and Hasty, A.H. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol.* 3, 545-556.
- Suzuki, Y., Iizuka, T., Kobayashi, T., Nishikawa, T., Atsumi, Y., Kadowaki, T., Oka, Y., Kadowaki, H., Taniyama, M., Hosokawa, K., Asahina, T., and Matsuoka, K. (1997). Diabetes mellitus associated with the 3243 mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation: insulin secretion and sensitivity. *Metabolism* 46, 1019-1023.
- Szalat, A., Durst, R., and Leitersdorf, E. (2016). Managing dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 431-444.
- Tanaka, M., Fuku, N., Nishigaki, Y., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., Kato, K., Yokoi, K., Ito, M., Nozawa, Y., and Yamada, Y. (2007). Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes* 56, 518-521.

- Taskinen, M.R., and Boren, J. (2015). New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 239, 483-495.
- Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M.A., Fadini, G.P., Albiero, M., Favaro, G., Ciciliot, S., Soriano, M.E., Morbidoni, V., Cerqua, C., *et al.* (2017). Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell. Metab.* 25, 1374-1389.e6.
- Torrioni, A., Petrozzi, M., D'Urbano, L., Sellitto, D., Zeviani, M., Carrara, F., Carducci, C., Leuzzi, V., Carelli, V., Barboni, P., De Negri, A., and Scozzari, R. (1997). Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1107-1121.
- Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., and Holman, R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 281, 2005-2012.
- Turner, R.C., Millns, H., Neil, H.A., Stratton, I.M., Manley, S.E., Matthews, D.R., and Holman, R.R. (1998). Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 316, 823-828.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433-446.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352, 854-865.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.
- Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M., Goldberg, T., and Vlassara, H. (2005). Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 461-466.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 44-84.
- van den Ouweland, J.M., Lemkes, H.H., Ruitenbeek, W., Sandkuijl, L.A., de Vijlder, M.F., Struyvenberg, P.A., van de Kamp, J.J., and Maassen, J.A. (1992). Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat. Genet.* *1*, 368-371.
- van der Vlies, D., Makkinje, M., Jansens, A., Braakman, I., Verkleij, A.J., Wirtz, K.W., and Post, J.A. (2003). Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid. Redox Signal.* *5*, 381-387.
- van Dieren, S., Beulens, J.W., van der Schouw, Y.T., Grobbee, D.E., and Neal, B. (2010). The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* *17 Suppl 1*, S3-8.
- van Greevenbroek, M.M., Schalkwijk, C.G., and Stehouwer, C.D. (2013). Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth. J. Med.* *71*, 174-187.
- van Leiden, H.A., Dekker, J.M., Moll, A.C., Nijpels, G., Heine, R.J., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D., and Polak, B.C. (2002). Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: the hoorn study. *Diabetes Care* *25*, 1320-1325.
- van Oven, M., and Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* *30*, E386-94.
- Victor, V.M., Rocha, M., Herance, R., and Hernandez-Mijares, A. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 3947-3958.
- Volchuk, A., and Ron, D. (2010). The endoplasmic reticulum stress response in the pancreatic beta-cell. *Diabetes Obes. Metab.* *12 Suppl 2*, 48-57.
- Vozarova, 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*, 455-461.
- Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G.A., and Kim, P.K. (2012). ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* *8*, 1462-1476.

- Wautier, M.P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M., and Wautier, J.L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *280*, E685-94.
- Weber, C., and Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* *17*, 1410-1422.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 872-884.
- Wu, J.J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Gutkind, S., Daniels, M.P., Komatsu, M., and Finkel, T. (2009). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)* *1*, 425-437.
- Xia, L., Wang, H., Munk, S., Kwan, J., Goldberg, H.J., Fantus, I.G., and Whiteside, C.I. (2008). High glucose activates PKC-zeta and NADPH oxidase through autocrine TGF-beta1 signaling in mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *295*, F1705-14.
- Xu, H., Czerwinski, P., Hortmann, M., Sohn, H.Y., Forstermann, U., and Li, H. (2008). Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc. Res.* *78*, 349-355.
- Xu, R., Zhang, S., Tao, A., Chen, G., and Zhang, M. (2014). Influence of vitamin E supplementation on glycaemic control: a meta-analysis of randomised controlled trials. *PLoS One* *9*, e95008.
- Yan, L.J. (2014). Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J. Diabetes Res.* *2014*, 137919.
- Yaribeygi, H., Atkin, S.L., and Sahebkar, A. (2018a). Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. *J. Cell. Physiol.*
- Yaribeygi, H., Atkin, S.L., and Sahebkar, A. (2018b). A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *J. Cell. Physiol.*
- Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* *337*, 1062-1065.
- Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2653-2658.

-
- Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., and Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* *148*, 209-214.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19860-19865.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., *et al.* (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* *108*, 1167-1174.
- Zhou, J., Massey, S., Story, D., and Li, L. (2018). Metformin: An Old Drug with New Applications. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 10.3390/ijms19102863.
- Zorzano, A., Liesa, M., and Palacin, M. (2009). Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Arch. Physiol. Biochem.* *115*, 1-12.
- Zoungas, S., Chalmers, J., Ninomiya, T., Li, Q., Cooper, M.E., Colagiuri, S., Fulcher, G., de Galan, B.E., Harrap, S., Hamet, P., *et al.* (2012). Association of HbA1c levels with vascular complications and death in patients with type 2 diabetes: evidence of glycaemic thresholds. *Diabetologia* *55*, 636-643.

ANEXO I. PUBLICACIONES



Article

Mitochondrial DNA Haplogroup JT is Related to Impaired Glycaemic Control and Renal Function in Type 2 Diabetic Patients

Noelia Diaz-Morales ¹ , Sandra Lopez-Domenech ¹, Francesca Iannantuoni ¹ ,
Ester Lopez-Gallardo ^{2,3,4}, Eva Sola ¹, Carlos Morillas ¹, Milagros Rocha ^{1,5,*},
Eduardo Ruiz-Pesini ^{2,3,4,6} and Victor M. Victor ^{1,5,*}

¹ Service of Endocrinology, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), 46017 Valencia, Spain;

nodiazmo@alumni.uv.es (N.D.-M.); Sandra.lopez@uv.es (S.L.-D.); franian@alumni.uv.es (F.I.);
eva.sola@uv.es (E.S.); carlos.morillas@uv.es (C.M.)

² Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, University of Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain;
esterlop@unizar.es (E.L.-G.); eduruz@unizar.es (E.R.-P.)

³ Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón), 50013 Zaragoza, Spain

⁴ Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 50013 Zaragoza, Spain

⁵ CIBERehd-Department of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

⁶ Fundación ARAID, 50018 Zaragoza, Spain

* Correspondence: victor.victor@uv.es (V.M.V.); milagros.rocha@uv.es (M.R.); Tel.: +34-961-622-757

Received: 17 July 2018; Accepted: 14 August 2018; Published: 16 August 2018



Abstract: The association between mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroup and risk of type 2 diabetes (T2D) is undetermined and controversial. This study aims to evaluate the impact of the main mtDNA haplogroups on glycaemic control and renal function in a Spanish population of 303 T2D patients and 153 healthy controls. Anthropometrical and metabolic parameters were assessed and mtDNA haplogroup was determined in each individual. Distribution of the different haplogroups was similar in diabetic and healthy populations and, as expected, T2D patients showed poorer glycaemic control and renal function than controls. T2D patients belonging to the JT haplogroup (polymorphism m.4216T>C) displayed statistically significant higher levels of fasting glucose and HbA_{1c} than those of the other haplogroups, suggesting a poorer glycaemic control. Furthermore, diabetic patients with the JT haplogroup showed a worse kidney function than those with other haplogroups, evident by higher levels of serum creatinine, lower estimated glomerular filtration rate (eGFR), and slightly higher (although not statistically significant) urinary albumin-to-creatinine ratio. Our results suggest that JT haplogroup (in particular, change at position 4216 of the mtDNA) is associated with poorer glycaemic control in T2D, which can trigger the development of diabetic nephropathy.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; mitochondrial haplogroup; mtDNA; nephropathy; glycaemic control

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) has become one of the most common metabolic diseases, with a rapid increase in its prevalence over recent decades, representing an enormous cost to public health organisms. It is obvious that environmental factors—such as diet and physical activity—play a key role in the pathogenesis of T2D, but an emerging body of evidence suggests that genetic factors can play an important role in the development and severity of T2D [1,2]. Therefore, characterization of new parameters that allow us

to identify individuals at a high risk of developing T2D or to predict a poor prognostic of the disease are likely to be of great use in clinical practice, for designing strategies for primary prevention and for personalising treatments according to each specific condition.

Mitochondrial dysfunction is well known to be involved in the pathophysiology of T2D, as it affects not only insulin secretion but also insulin resistance [3,4]. In this sense, genetic factors such as mitochondrial DNA (mtDNA) variations may affect mitochondrial function and lead to the development of diabetes [5]. For example, an mtDNA mutation at nucleotide m.3243A>G has been described to cause maternally inherited diabetes and deafness [6,7]. Another relatively common variant, mtDNA m.16189T>C, has been associated with an enhanced risk of type 2 diabetes in Asian [8] and European [9] populations. Mitochondrial DNA haplogroups are defined by common variants of single nucleotide point (SNP) mutations of the mtDNA that result in a division of the population into discrete groups, each of which shares a common maternal ancestor. Although some studies have suggested mitochondrial haplogroups are involved in the genetic susceptibility of T2D [10–12], this connection is not altogether clear, as other authors have reported that haplogroups are unlikely to play a role in the risk of developing this disorder [13,14].

Type 2 diabetes is characterised by inadequate metabolic control associated with subsequent micro- and macro-vascular complications. Fasting plasma glucose levels indicate how efficiently glucose levels are managed in the absence of dietary glucose, while glycated haemoglobin (HbA_{1c}) provides information regarding average blood glucose levels over the previous 8–12 weeks, thus representing an objective measurement of glycaemic control [15]. An association between poor glycaemic control and enhanced risk of microvascular complications, such as nephropathy, has been widely reported in diabetic patients [16,17]. Furthermore, some authors have suggested an effect of mtDNA haplogroups on the risk of developing diabetic complications in T2D [11,18,19]. However, whether or not mitochondrial haplogroups are involved in the glycaemic control of type 2 diabetic patients and the subsequent development of microvascular complications, such as nephropathy, has not yet been studied.

In the present study, we assessed a Spanish population of 303 T2D patients and 153 healthy controls with the aim of investigating differences in metabolic parameters and renal dysfunction markers according to the main mitochondrial macro-haplogroups.

2. Experimental Section

2.1. Subjects

Our study population was composed of 303 T2D patients and 153 healthy volunteers recruited at the Endocrinology and Nutrition Service of the University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain). T2D was diagnosed according to the criteria of the American Diabetes Association 2017 [20] (fasting plasma glucose ≥ 126 mg/dL, or 2-h plasma glucose ≥ 200 mg/dL after a 75 g oral glucose tolerance test, or HbA_{1c} $\geq 6.5\%$, or random plasma glucose ≥ 200 mg/dL). Subjects who met any of the following criterion were excluded from the study: history of cardiovascular disease (stroke, ischemic heart disease, peripheral vascular disease, and chronic disease related to cardiovascular risk); severe disease including malignancies, autoimmune, inflammatory or infectious diseases; and abnormal haematological profile.

Written informed consent was obtained from all the participants before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, and approved by the Ethics Committee of the University Hospital Dr. Peset (Project identification code: 97/16).

2.2. Anthropometric and Biochemical Parameters

During the medical appointment, weight (kg), height (m), systolic and diastolic blood pressure (SBP, DBP; mm Hg), and waist and hip circumference (cm) were measured in all the participants. Body mass index (BMI; kg/m²) and waist-to-hip ratio (WHR) were then calculated.

Venous blood samples were collected in fasting conditions from both control and type 2 diabetic subjects and centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min at 4 °C to obtain serum, in which levels of glucose,

total cholesterol and triglycerides were determined by means of an automated enzymatic method using a Beckman Synchron LX20 Pro analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). High-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels were measured using a direct method with a Beckman Synchron LX20 Pro analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was calculated with Friedewald's formula. Insulin was measured with an Immulite 1000 automated immunoassay system (Siemens Healthcare SL, Madrid, Spain) and the homeostasis model assessment index of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated to estimate insulin resistance using fasting insulin and glucose levels: $HOMA = [\text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mg/dL})] / 405$. HOMA index was only calculated for patients not undergoing insulin therapy. Percentage of HbA_{1c} was measured by means of an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkray Inc., Kyoto, Japan) and high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels were assessed with the Dade Behring Nephelometer II Analyzer System using an immunonephelometric assay (Dade Behring, Deerfield, IL, USA).

Creatinine in serum and urine was determined by Jaffe's reaction. Measurements of urinary albumin concentrations were performed by turbidimetry with an Architect c-16000 autoanalyzer (Abbott, Lake Bluff, IL, USA). Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by the CKD-EPI equation from serum creatinine [21].

2.3. Haplotyping

Total DNA was extracted from whole blood with the REALPURE "SSS" Kit (Durviz SL, Valencia, Spain) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Mitochondrial haplogroups HV, JT and U were defined by the mtDNA polymorphisms m.7028C>T, m.12308A>G, m.4216T>C and m.14766T>C [22]. These haplogroups encompass around 90% of the Spanish population [23]. Samples revealing other haplogroups with low frequencies among the population (those not classified as HV, JT or U) were grouped altogether and referred to as "Others". Custom designed Taqman®SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used to analyse mtDNA genetic variants and samples were run in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The analysis consisted of a pre-read and post-read step of the plate of 30 s at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, before and after the PCR cycle. The cycle conditions were 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Information on the haplogroups, dyes, probes and primers in each assay is widely explained in Nogales-Gadea et al. [24]. For each genotype analysis, positive and negative controls from different previously characterised mtDNA aliquots were used to ensure an adequate internal control.

2.4. Statistical Analysis

Results were processed using SPSS Software version 17.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA) for statistical analysis. Data in tables are presented as means \pm standard deviation for normally distributed data, medians (25th and 75th quartile) for non-normally distributed data, or percentage for qualitative variables. Figures show mean and standard error of the mean. Potential differences between haplogroups were analysed by ANOVA for normally distributed variables and the Kruskal-Wallis test for non-normally distributed variables. When differences among groups were detected, Student-Newman-Keuls or Dunn's multiple-comparison post hoc test were applied, as appropriate. Frequencies in T2D patients and control subjects were compared using the chi-square test. A Student's *t*-test was employed to evaluate differences between controls and type 2 diabetic patients. The effect of possible covariates (such as age, sex, BMI or duration of diabetes) was analyzed with a univariate general linear model. For all the tests, a two-tailed $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of the Study Population

Our observational study included 303 type 2 diabetic patients and 153 healthy controls. Haplogroup distribution, and anthropometrical and inflammatory characteristics, as well as lipid profile of the studied participants are shown in Table 1.

Table 1. Haplogroup distribution and characteristics of the study population. Anthropometrical, inflammatory and lipid profile.

Haplogroup	Healthy Controls						Type 2 Diabetic Patients						p-value *
	HV	JT	U	Others	Total	p-value	HV	JT	U	Others	Total	p-value	
N (%)	81 (52.9)	26 (17.0)	35 (22.9)	11 (7.2)	153 (100)	-	165 (54.5)	43 (14.2)	65 (21.4)	30 (9.9)	303 (100)	-	
Male %	37.0	41.9	23.7	27.3	34.2	0.36	68.5	81.8	77.3	66.7	72.1	0.22	
Age (years)	41.3 ± 16.4	45.3 ± 16.0	41.5 ± 15.7	40.0 ± 14.0	41.9 ± 16.0	0.68	58.6 ± 9.8	59.5 ± 9.3	58.4 ± 9.9	59.3 ± 7.8	58.8 ± 9.5	0.92	
BMI (kg/m ²)	24.4 ± 3.7	25.6 ± 4.5	25.2 ± 4.2	23.7 ± 2.3	24.8 ± 24.8	0.39	30.8 ± 4.8	30.2 ± 3.8	30.1 ± 4.4	31.2 ± 4.2	30.6 ± 4.5	0.68	
WHR	0.83 ± 0.08	0.84 ± 0.13	0.85 ± 0.09	0.79 ± 0.08	0.83 ± 0.09	0.41	0.98 ± 0.08	0.97 ± 0.06	1.00 ± 0.08	0.98 ± 0.07	0.98 ± 0.08	0.58	
SBP (mmHg)	122 ± 18	123 ± 21	122 ± 18	116 ± 16	122 ± 18	0.80	133 ± 18	132 ± 15	135 ± 18	137 ± 18	134 ± 17	0.79	
DBP (mmHg)	73 ± 10	73 ± 10	77 ± 14	72 ± 11	74 ± 11	0.45	78 ± 10	79 ± 11	79 ± 9	77 ± 11	78 ± 10	0.88	
Duration of diabetes	-	-	-	-	-	-	10.1 ± 8.4	9.7 ± 6.7	11.0 ± 8.5	10.6 ± 6.7	10.2 ± 8.0	0.87	
His-CRP (mg/L)	0.82	1.07	1.04	1.24	1.01	0.76	2.57	2.34	2.56	2.53	2.53	0.86	
TC (mg/dL)	(0.45–2.23)	(0.40–3.16)	(0.45–2.86)	(0.31–2.60)	(0.45–2.60)	0.62	(1.19–5.76)	(1.09–5.24)	(0.95–5.61)	(1.04–5.20)	(1.08–5.50)	0.35	
HDL-c (mg/dL)	189 ± 35	194 ± 29	190 ± 42	203 ± 32	191 ± 36	0.76	180 ± 41	181 ± 45	170 ± 36	182 ± 33	178 ± 40	0.62	
LDL-c (mg/dL)	55.9 ± 16.5	54.5 ± 16.0	54.7 ± 11.6	59.9 ± 13.1	55.7 ± 15.1	0.67	42.8 ± 11.0	41.9 ± 11.4	41.4 ± 9.5	44.3 ± 9.5	42.5 ± 10.6	0.34	
Triglycerides (mg/dL)	115 ± 31	122 ± 28	118 ± 35	125 ± 24.9	118 ± 30.9	0.63	109 ± 36.0	108 ± 37.3	100 ± 33.1	109 ± 32.4	107 ± 35.3	0.94	
	69 (51–114)	70 (47–104)	75 (58–94)	86 (60–117)	73 (54–104)	0.63	122 (88–176)	123 (101–156)	129 (94–200)	134 (101–172)	125 (93–174)	0.94	

Normally distributed data are shown as mean ± SD and non-normally distributed data as median (25th–75th quartiles). p-value * when comparing type 2 diabetic patients (Total) vs. healthy controls (Total). Abbreviations: BMI, body-mass index; DBP, diastolic blood pressure; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; SBP, systolic blood pressure; SD, standard deviation; TC, total cholesterol; WHR, waist-to-hip ratio.

Our cohort of healthy controls showed a haplogroup distribution similar to that reported in a larger Spanish population by Dahmany et al. [23]. No differences were found in the distribution of the different macro-haplogroups between control subjects and diabetic patients ($p = 0.68$). Although our cohort of T2D patients was characterised by higher age and percentage of men with respect to the control population ($p < 0.001$), when sub-classified by haplogroup, no differences were found in these parameters among haplogroups in the diabetic population ($p = 0.92$ for age and $p = 0.22$ for male percentage) and control subjects ($p = 0.68$ for age and $p = 0.36$ for male percentage). As expected, T2D patients in total had higher body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) ($p < 0.001$) than control subjects. Lipid profile in the diabetic patients showed typical characteristics of atherogenic dyslipidemia, with elevated levels of triglycerides ($p < 0.001$ vs. control) and low levels of HDL-c ($p < 0.001$ when compared to control subjects). The lower levels of total cholesterol ($p = 0.001$) and LDL-c ($p = 0.002$) found in diabetic patients vs. controls were probably due to the fact that most of the patients were being treated with antihyperlipidemic agents (Table 2). No statistically significant differences in the studied parameters were detected according to haplogroup in the type 2 diabetic population or the control group (see Table 1 for p -values).

Pharmacologic treatment of the type 2 diabetic patients included in this study is shown in Table 2. No significant differences were observed between the percentages of patients treated with hypolipidemic, antidiabetic, and antihypertensive agents (see Table 2 for p -values).

Table 2. Pharmacological treatment of the study's cohort of type 2 diabetic patients.

	HV	JT	U	Others	Total	p -value
Statins (%)	56.5	50.0	53.2	56.0	54.7	0.91
Fibrate (%)	13.0	19.4	8.5	12.0	13.0	0.54
Ezetimibe (%)	3.2	5.0	6.7	0.0	4.0	0.73
Metformin (%)	63.8	83.3	77.6	60.0	69.5	0.06
DPP-4 inhibitors (%)	33.9	45.0	41.9	42.9	38.6	0.76
Insulin (%)	29.3	19.4	30.6	20.0	27.0	0.51
Sulfonilureas (%)	18.8	14.3	10.4	33.3	17.8	0.11
Glitazones (%)	7.8	19.4	4.1	12.0	9.3	0.09
Glinides (%)	21.6	16.7	8.2	32.0	19.0	0.07
GLP-1 agonists (%)	19.4	15.0	6.5	21.4	15.7	0.40
Antihypertensive (%)	45.2	43.2	49.0	48.0	46.0	0.95

Abbreviations: DPP-4, dipeptidil peptidasa-4; GLP-1, glucagon-like peptide-1.

3.2. Glucose Metabolism

First analysis performed was a comparison between T2D patients and controls as a whole, without subdividing by haplogroup (Table A1). As expected, type 2 diabetic patients showed higher levels of fasting glucose, HbA_{1c}, fasting insulin and HOMA-IR index than control subjects ($p < 0.001$). Differences between controls and subjects with T2D remained statistically significant after adjustment for age, sex, and BMI ($p < 0.001$ for glucose, HbA_{1c} and HOMA; $p = 0.01$ for insulin). Graphs showing parameters related with glycaemic control and insulin resistance are plotted in Figure 1. Differences in glucose, HbA_{1c}, insulin, and HOMA between control subjects and T2D patients remained significant after subdivided by haplogroup ($p < 0.001$ for glucose, HbA_{1c}, and HOMA when comparing control vs T2D belonging to haplogroups HV, JT, U, and Others. For insulin levels: $p < 0.001$ when comparing control vs T2D in haplogroup HV; $p < 0.01$ in haplogroup JT; and $p < 0.05$ in haplogroups U and Others. Differences in p -values found in the levels of insulin are attributable to differences in the sample size between haplogroups).

Interestingly, diabetic patients with the JT haplogroup showed significantly higher levels of fasting glucose ($p = 0.001$) and HbA_{1c} ($p = 0.007$) compared to patients belonging to the other haplogroups analysed (grey bars in Figure 1A,B). These differences remained statistically significant

despite adjustments for duration of diabetes ($p = 0.006$ for fasting glucose and $p = 0.002$ for HbA_{1c}). Nevertheless, no differences were found in the levels of fasting insulin ($p = 0.50$) and HOMA-IR index ($p = 0.38$) when T2D patients with different haplogroups were compared (grey bars in Figure 1C,D). Control subjects did not reveal differences depending on haplogroup for any of the parameters related with glycaemic control and insulin resistance (white bars in Figure 1; glucose: $p = 0.70$; HbA_{1c}: $p = 0.81$; insulin: $p = 0.60$; HOMA-IR: $p = 0.83$).

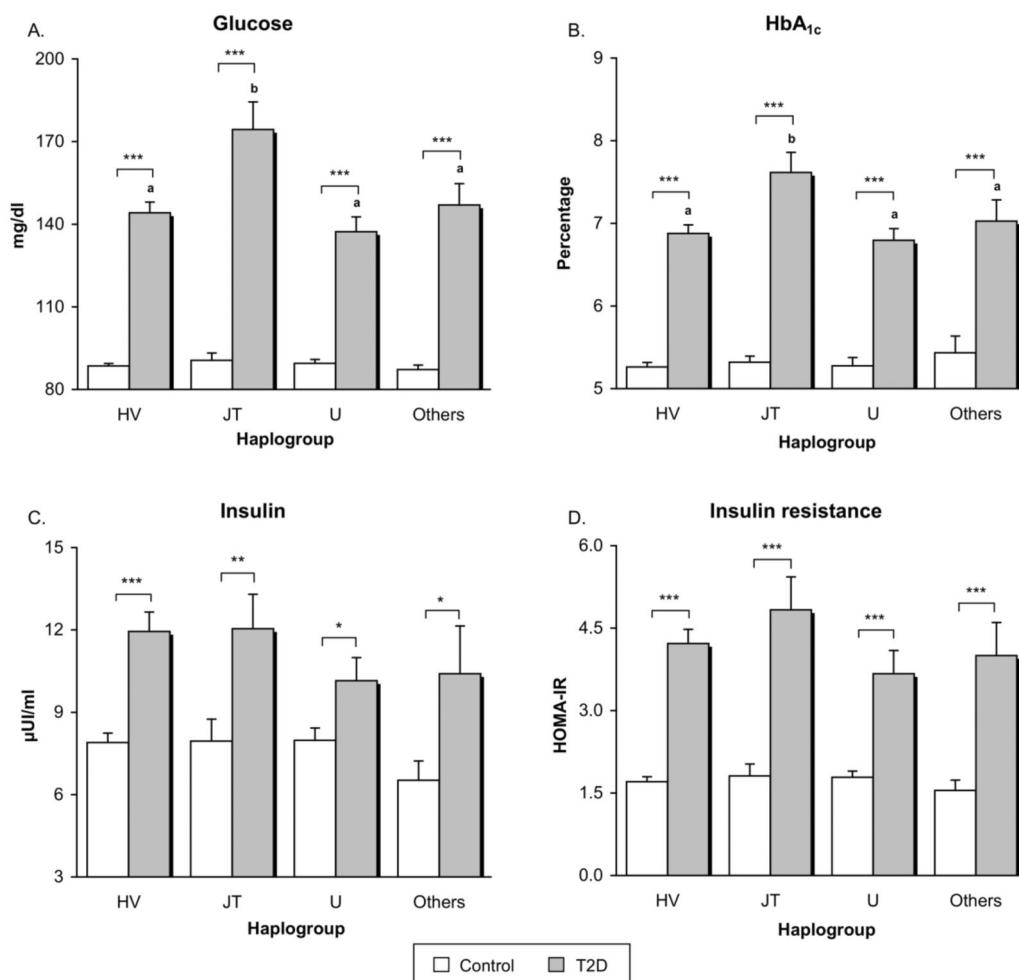


Figure 1. Glycaemic control and insulin resistance-related parameters in healthy controls and type 2 diabetic patients belonging to the main mitochondrial macro-haplogroups. **(A)** Serum levels of fasting glucose (expressed as mg/dL); **(B)** Percentage of glycated haemoglobin (HbA_{1c}) levels; **(C)** Serum levels of fasting insulin ($\mu\text{UI}/\text{mL}$); **(D)** HOMA-IR index calculated as $[\text{fasting insulin } (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mg}/\text{dL})]/405$. Only patients not treated with insulin therapy are included in the graphs of fasting insulin and HOMA-IR. Grey bars show type 2 diabetic patients and white bars represent controls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared controls vs. type 2 diabetic subjects. Letters indicate significant differences among type 2 diabetic patients with different haplogroups ($p < 0.05$) when compared by means of one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test (i.e., bars tagged with the same letter do not differ significantly from each other, while bars with no letter in common are significantly different from each other ($p < 0.05$)). Abbreviations: HbA_{1c}, glycated haemoglobin; HOMA-IR, Homeostasis model assessment index of insulin resistance; T2D, Type 2 diabetes.

3.3. Renal Function

Type 2 diabetic patients, when analyzed as a whole, exhibited lower kidney function than control subjects, expressed by higher serum creatinine concentrations ($p < 0.001$) and lower eGFR ($p < 0.001$) (Appendix Table A1). Differences in eGFR between controls and patients remained when adjusted by age, sex, and BMI ($p = 0.04$), whereas differences in creatinine levels were not longer statistically significant after adjusting for age, sex, and BMI ($p = 0.12$). After subdivided by haplogroup, differences between T2D patients and controls remained statistically significant only in haplogroups HV ($p < 0.001$) and JT ($p < 0.05$) for serum creatinine, and in haplogroups HV ($p < 0.01$), JT ($p < 0.05$), and Others ($p < 0.05$) for eGFR. Differences in p -values found between the different haplogroups are probably due to differences in the sample size.

In the case of T2D patients, those with the JT haplogroup showed a worse renal function than patients belonging to HV, U, and Others haplogroups, manifested as significantly higher levels of serum creatinine (grey bars in Figure 2A, $p < 0.001$) and lower eGFR (grey bars in Figure 2B, $p = 0.01$). Differences between the JT group and all the other macro-haplogroups in creatinine levels and eGFR did not change in the diabetic population after adjusting by duration of diabetes ($p < 0.001$ for creatinine levels and $p = 0.003$ for eGFR). Control subjects did not reveal statistically significant differences in kidney function according to haplogroups (white bars in Figure 2; $p = 0.09$ for creatinine and $p = 0.27$ for eGFR).

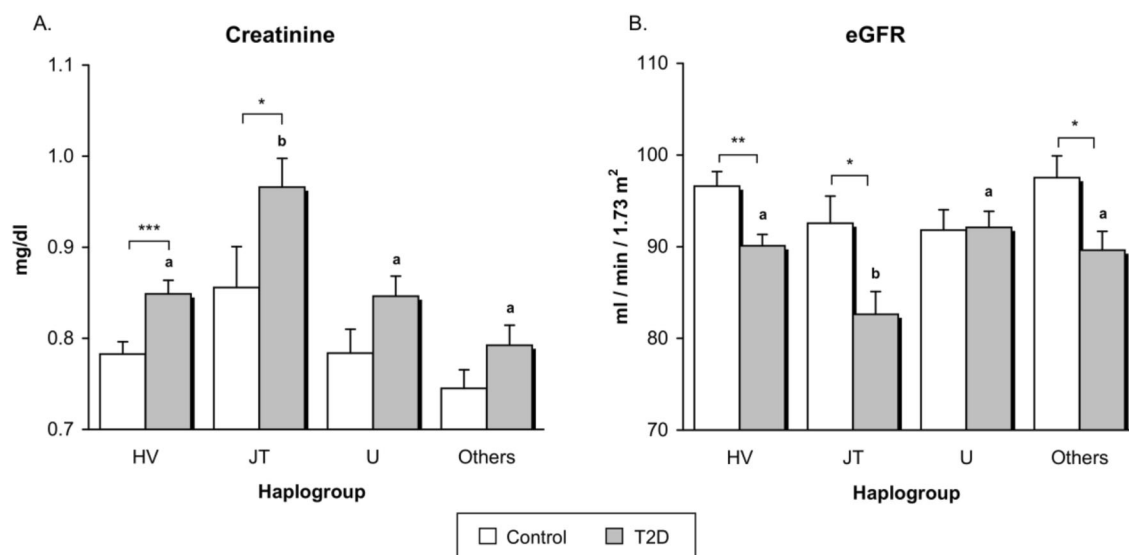


Figure 2. Assessment of renal function in healthy volunteers and type 2 diabetic patients subdivided by mitochondrial haplogroup. (A) Concentrations of serum creatinine; (B) Levels of estimated glomerular filtration rate (eGFR). White bars correspond to controls, while grey bars represent type 2 diabetic patients. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in controls vs. type 2 diabetic subjects. Letters indicate significant differences among type 2 diabetic patients with different haplogroups ($p < 0.05$) when compared by means of one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test (i.e., bars tagged with the same letter do not differ significantly from each other, while bars with no letter in common are significantly different from each other, ($p < 0.05$)). Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate; T2D, Type 2 diabetes.

In light of the above mentioned results, we also analyzed concentrations of urinary albumin and creatinine in patients in whom said parameters were measured on the same day as blood was extracted; namely, in a total of 106 type 2 diabetic patients (52 from the HV group, 16 from the JT group, 26 from the U group, and 12 from the “Others” group). Urinary albumin-to-creatinine ratio (mg/g) was slightly higher in the JT group (19.46 ± 17.54 mg/g) than in those belonging to the other

haplogroups (HV: 12.55 ± 7.92 mg/g; U: 12.54 ± 8.73 mg/g; others: 12.49 ± 7.33 mg/g), although it did not reach statistical significance in the one-way ANOVA test ($p = 0.099$).

4. Discussion

In the present study, we have performed a case-control study to explore the possible effects of the main mitochondrial haplogroups on metabolic control and renal function in a Spanish population of 303 type 2 diabetic patients and 153 healthy controls. We have observed that T2D patients belonging to the JT macrohaplogroup showed enhanced levels of fasting plasma glucose, HbA1c, creatinine, and decreased eGFR when compared to patients from the other haplogroups (HV, U, and Others), thus suggesting poorer metabolic control and renal function in T2D patients with the JT haplogroup.

Mitochondria are responsible for the cell's energy supply through oxidative phosphorylation (OXPHOS), and some of the proteins involved in this process are encoded in the mtDNA. Given the importance of OXPHOS in insulin secretion [25,26], different genetic variants are potential candidates for playing a role in the susceptibility to or protection against metabolic defects [13]. Mitochondrial haplogroups are clusters of phylogenetically related mtDNA haplotypes that might have been selected during evolution to permit humans to adapt to famine or cold climates [27]. It has been suggested that these mtDNA variants contribute to energy metabolism and, hence, may be associated with metabolic diseases [28]. Crispim et al. [10] reported that the European-specific JT mitochondrial haplogroup was associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Caucasian-Brazilian patients, as patients belonging to the JT cluster exhibited higher levels of HOMA-IR. In addition, the J1 haplogroup is thought to be involved in susceptibility to type 2 diabetes among Caucasian (Jewish) patients depending on family health history [29]. According to several studies performed in Asian populations, individuals carrying haplogroup N9a are less susceptible to type 2 diabetes and metabolic syndrome [30,31]. However, in spite of this evidence, the association between mitochondrial haplogroups and type 2 diabetes is not clear, with many studies providing conflicting results or failing to find significant associations [13,14,18,32]. Our results do not show a direct association of the development of T2D with the main macro-haplogroups, as no differences were found in the frequencies of each haplogroup between our diabetic and control populations. Interestingly, we found that patients belonging to the JT cluster presented poorer glycaemic control and higher levels of fasting glucose and HbA1c, than other patients, thus suggesting that said haplogroup is involved in the metabolism of glucose in patients with T2D. Our findings are in agreement with those reported by Crispim et al. [10] which described higher levels of HOMA-IR in patients with JT haplogroup, although no statistically significant differences were found in our cohort of type 2 diabetic patients, probably because the size of our sample was smaller than the sample size in the cited work.

Type 2 diabetes and inadequate glycaemic control are frequently associated with macro- and micro-vascular complications. Whether or not mitochondrial haplogroups play a role in modulating the development of T2D-related complications is a question that has been widely studied. Achilli et al. [18] found an association of various mitochondrial haplogroups and increased risk of diabetic complications in an Italian population: haplogroup H3 increased the probability of developing neuropathy; haplogroup H was linked to retinopathy; and subjects harbouring V and U3 mtDNA showed enhanced incidence of renal failure and nephropathy. In this context, it is worth pointing out that diabetic nephropathy has been associated with specific mitochondrial haplogroups in several studies; for instance, Feder et al. [33] reported a link with the J1 haplogroup in an Ashkenazi Jewish population, while Niu et al. [11] reported a link with the N9a haplogroup in a Chinese population. Our data are in accordance with an involvement of mitochondrial haplogroup in the development of nephropathy, as our type 2 diabetic patients belonging to the JT haplogroup showed higher levels of serum creatinine and lower levels of eGFR compared to patients belonging to the other haplogroups analyzed. Interestingly, though not statistically significant, T2D patients harbouring the JT haplogroup also presented a higher urinary albumin-to-creatinine ratio. Taken together, these results suggest T2D patients with the JT haplogroup are likely to have impaired kidney function.

The variant m.4216T>C, a key SNP for defining the JT macro-haplogroup [34], leads to a non-synonymous amino acid change in the mtDNA *MT-ND1* gene encoding NADH:Ubiquinone oxidoreductase core subunit 1 (p.MT-ND1), one of the components of the mitochondrial respiratory complex I. Electrons coming from glucose metabolism through glycolysis and the Krebs cycle are principally stored in NADH for ATP production and oxygen reduction. It has been proposed that hyperglycaemia can increase the production of the complex I substrate NADH [35]. Overproduction of NADH leads to an electron pressure on the mitochondrial electron transport chain that drives to an increase in electron leakage and the subsequent high production of reactive oxygen species (ROS) [36,37]. As the major enzyme implicated in NADH recycling, mitochondrial complex I impairment can lead to further increased levels of NADH [38], with the following enhancement of ROS. Altogether these mechanisms will induce oxidative stress, which has been widely reported as a central player in the development of insulin resistance, pancreatic β -cells dysfunction, and finally, type 2 diabetes [39–41]. A recent study has demonstrated that pharmacological inhibition of complex I of mitochondrial electron transport chain improves glucose homeostasis and ameliorates hyperglycaemia [42]. Our findings bring us to hypothesize that variant m.4216T>C results in aberrant activity of complex I that, under diabetic conditions, leads to poorer glycaemic control. For this reason, we suggest that inhibitors of complex I—such as metformin and thiazolidinediones [43]—may be adequate drugs for the treatment of T2D patients belonging to the JT haplogroup.

Both hyperglycaemia and excessive oxidative stress are well known to be involved in the development of diabetic vascular complications [44,45], including microvascular complications such as nephropathy [46]. The kidney is especially vulnerable to the damage produced by hyperglycaemia-induced oxidative stress; in fact said damage has been suggested as an important mechanism involved in the pathogenesis of tubular and glomerular abnormalities [46].

The present study has some limitations in terms of statistical power. We did not perform a previous sample size estimation due to the lack of studies addressing the role of the haplogroups here studied (HV, JT, U, and others) on metabolic control and renal function. However, we consider that our study has enough power for reaching statistically significant differences among different haplogroups in the diabetic population. Nevertheless, researches in larger populations will serve to confirm these results.

Together, this evidence leads us to hypothesize that the JT haplogroup (in particular, change at position 4216 of the mtDNA) might result in a poorer glycaemic control in type 2 diabetic patients, thus contributing to the development of diabetic nephropathy. Future studies with a larger sample size would help to confirm our results and, if corroborated, haplogroup screening in recently diagnosed T2D patients might be suggested as a way of predicting disease progression and choosing the most adequate clinical treatment for avoiding macro and microvascular-associated complications.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.V., M.R., and E.R.-P.; Methodology, N.D.-M., F.I., S.L.-D. and E.L.-G.; Validation, V.M.V., E.R.-P., M.R., and N.D.-M.; Formal Analysis, N.D.-M. and M.R.; Investigation, N.D.-M., F.I., S.L.-D., and E.L.-G.; Resources, V.M.V., E.R.-P., E.S., and C.M.; Data Curation, N.D.-M. and F.I.; Writing-Original Draft Preparation, N.D.-M. and V.M.V.; Writing-Review and Editing, V.M.V., M.R., E.R.-P., N.D.-M., F.I., S.L.-D., E.L.-G., E.S., and C.M.; Visualization, N.D.-M. and M.R.; Supervision, V.M.V., M.R., and E.R.-P.; Project Administration, V.M.V., M.R., and E.R.-P.; Funding Acquisition, V.M.V., M.R., and E.R.-P.

Funding: This research was funded by grants from Carlos III Health Institute (ISCIII) (PI16/1083, PI16/0301, PI14/00070, PI17/00166); CIBERehd (CB06/04/0071) and CIBERER—initiatives of the ISCIII; the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”); and Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón (Grupos de Referencia B33_17R); Unrestricted grant from Menarini S.A.; N.D.-M. and S.L.-D. are recipient of PFIS contracts from Carlos III Health Institute (FI14/00125 and FI14/00350, respectively). F.I. has a contract from Generalitat Valenciana (GRISOLIAP/2016/015). V.M.V. and M.R. are recipients of contracts from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government and Carlos III Health Institute (CES10/030 and CPII16/00037, respectively).

Acknowledgments: The authors thank Brian Normanly (University of Valencia-CIBERehd) for his editorial assistance, and Rosa Falcon (FISABIO) for her technical assistance.

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

Appendix

Table A1. Differences in glycaemic control and renal function between controls and type 2 diabetic patients.

	Healthy Controls	Type 2 Diabetic Patients	<i>p</i> -value	Age, Sex, and BMI Adjusted <i>p</i> -value
Glucose (mg/dL)	89.04 ± 8.93	147.39 ± 50.87	<0.001	<0.001
HbA _{1c} (%)	5.28 ± 0.32	6.99 ± 1.32	<0.001	<0.001
Insulin (μUI/mL)	7.84 ± 2.98	11.50 ± 5.91	<0.001	0.013
HOMA-IR	1.73 ± 0.76	4.21 ± 2.39	<0.001	<0.001
Creatinine (mg/dL)	0.79 ± 0.12	0.86 ± 0.17	<0.001	0.12
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	94.92 ± 9.93	89.39 ± 13.19	<0.001	0.04

Data are shown as mean ± SD. Abbreviations: BMI, body-mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HbA_{1c}, glycated haemoglobin; HOMA-IR: Homeostasis model assessment index of insulin resistance; SD: standard deviation.

References

1. Ali, O. Genetics of type 2 diabetes. *World J. Diabetes* **2013**, *4*, 114–123. [CrossRef] [PubMed]
2. Hara, K.; Shojima, N.; Hosoe, J.; Kadowaki, T. Genetic architecture of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *452*, 213–220. [CrossRef] [PubMed]
3. Supale, S.; Li, N.; Brun, T.; Maechler, P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 477–487. [CrossRef] [PubMed]
4. Gonzalez-Franquesa, A.; Patti, M.E. Insulin Resistance and Mitochondrial Dysfunction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *982*, 465–520. [CrossRef] [PubMed]
5. Kwak, S.H.; Park, K.S. Role of mitochondrial DNA variation in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2016**, *21*, 1151–1167. [PubMed]
6. Van den Ouweland, J.M.; Lemkes, H.H.; Ruitenbeek, W.; Sandkuijl, L.A.; de Vijlder, M.F.; Struyvenberg, P.A.; van de Kamp, J.J.; Maassen, J.A. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat. Genet.* **1992**, *1*, 368–371. [CrossRef] [PubMed]
7. Reardon, W.; Ross, R.J.; Sweeney, M.G.; Luxon, L.M.; Pembrey, M.E.; Harding, A.E.; Trembath, R.C. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* **1992**, *340*, 1376–1379. [CrossRef]
8. Park, K.S.; Chan, J.C.; Chuang, L.M.; Suzuki, S.; Araki, E.; Nanjo, K.; Ji, L.; Ng, M.; Nishi, M.; Furuta, H.; et al. Study group of molecular diabetology in Asia A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. *Diabetologia* **2008**, *51*, 602–608. [CrossRef] [PubMed]
9. Ye, Z.; Gillson, C.; Sims, M.; Khaw, K.T.; Plotka, M.; Poulton, J.; Langenberg, C.; Wareham, N.J. The association of the mitochondrial DNA OriB variant (16184–16193 polycytosine tract) with type 2 diabetes in Europid populations. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1907–1913. [CrossRef] [PubMed]
10. Crispim, D.; Canani, L.H.; Gross, J.L.; Tschiedel, B.; Souto, K.E.; Roisenberg, I. The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: An analysis of the m.4216T>C and m.4917A>G variants. *Ann. Hum. Genet.* **2006**, *70*, 488–495. [CrossRef] [PubMed]
11. Niu, Q.; Zhang, W.; Wang, H.; Guan, X.; Lu, J.; Li, W. Effects of mitochondrial haplogroup N9a on type 2 diabetes mellitus and its associated complications. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *10*, 1918–1924. [CrossRef] [PubMed]
12. Jiang, W.; Li, R.; Zhang, Y.; Wang, P.; Wu, T.; Lin, J.; Yu, J.; Gu, M. Mitochondrial DNA Mutations Associated with Type 2 Diabetes Mellitus in Chinese Uyghur Population. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16989. [CrossRef] [PubMed]
13. Saxena, R.; de Bakker, P.I.; Singer, K.; Mootha, V.; Burt, N.; Hirschhorn, J.N.; Gaudet, D.; Isomaa, B.; Daly, M.J.; Groop, L.; et al. Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 54–61. [CrossRef] [PubMed]
14. Chinnery, P.F.; Mowbray, C.; Patel, S.K.; Elson, J.L.; Sampson, M.; Hitman, G.A.; McCarthy, M.I.; Hattersley, A.T.; Walker, M. Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: A study of 897 cases and 1010 controls. *J. Med. Genet.* **2007**, *44*, e80. [CrossRef] [PubMed]
15. Nathan, D.M.; Turgeon, H.; Regan, S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia* **2007**, *50*, 2239–2244. [CrossRef] [PubMed]

16. Klein, R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* **1995**, *18*, 258–268. [CrossRef] [PubMed]
17. Stratton, I.M.; Adler, A.I.; Neil, H.A.; Matthews, D.R.; Manley, S.E.; Cull, C.A.; Hadden, D.; Turner, R.C.; Holman, R.R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *BMJ* **2000**, *321*, 405–412. [CrossRef] [PubMed]
18. Achilli, A.; Olivieri, A.; Pala, M.; Hooshyar Kashani, B.; Carossa, V.; Perego, U.A.; Gandini, F.; Santoro, A.; Battaglia, V.; Grugni, V.; et al. Mitochondrial DNA backgrounds might modulate diabetes complications rather than T2DM as a whole. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21029. [CrossRef] [PubMed]
19. Estopinal, C.B.; Chocron, I.M.; Parks, M.B.; Wade, E.A.; Roberson, R.M.; Burgess, L.G.; Brantley, M.A., Jr.; Samuels, D.C. Mitochondrial haplogroups are associated with severity of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 5589–5595. [CrossRef] [PubMed]
20. American Diabetes Association 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* **2017**, *40*, S11–S24. [CrossRef] [PubMed]
21. Levey, A.S.; Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Zhang, Y.L.; Castro, A.F., 3rd; Feldman, H.I.; Kusek, J.W.; Eggers, P.; Van Lente, F.; Greene, T.; et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 604–612. [CrossRef] [PubMed]
22. Van Oven, M.; Kayser, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, E386–E394. [CrossRef] [PubMed]
23. Dahmany, Y.; Marcuello, A.; Montiel-Sosa, F.; Martínez-Redondo, D.; Montoya, J.; Díez-Sánchez, C.; López-Pérez, M.; Ruiz-Pesini, E. Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: Anticipating association studies. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **2006**, *72*, 37–47.
24. Nogales-Gadea, G.; Pinos, T.; Ruiz, J.R.; Marzo, P.F.; Fiuza-Luces, C.; Lopez-Gallardo, E.; Ruiz-Pesini, E.; Martin, M.A.; Arenas, J.; Moran, M.; et al. Are mitochondrial haplogroups associated with elite athletic status? A study on a Spanish cohort. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 905–908. [CrossRef] [PubMed]
25. Olsson, A.H.; Yang, B.T.; Hall, E.; Taneera, J.; Salehi, A.; Nitert, M.D.; Ling, C. Decreased expression of genes involved in oxidative phosphorylation in human pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* **2011**, *165*, 589–595. [CrossRef] [PubMed]
26. Sharoyko, V.V.; Abels, M.; Sun, J.; Nicholas, L.M.; Mollet, I.G.; Stamenkovic, J.A.; Gohring, I.; Malmgren, S.; Storm, P.; Fadista, J.; et al. Loss of TFB1M results in mitochondrial dysfunction that leads to impaired insulin secretion and diabetes. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5733–5749. [CrossRef] [PubMed]
27. Mishmar, D.; Ruiz-Pesini, E.; Golik, P.; Macaulay, V.; Clark, A.G.; Hosseini, S.; Brandon, M.; Easley, K.; Chen, E.; Brown, M.D.; et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 171–176. [CrossRef] [PubMed]
28. Ruiz-Pesini, E.; Mishmar, D.; Brandon, M.; Procaccio, V.; Wallace, D.C. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* **2004**, *303*, 223–226. [CrossRef] [PubMed]
29. Feder, J.; Ovadia, O.; Blech, I.; Cohen, J.; Wainstein, J.; Harman-Boehm, I.; Glaser, B.; Mishmar, D. Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Med. Genet.* **2009**, *10*, 60. [CrossRef] [PubMed]
30. Fuku, N.; Park, K.S.; Yamada, Y.; Nishigaki, Y.; Cho, Y.M.; Matsuo, H.; Segawa, T.; Watanabe, S.; Kato, K.; Yokoi, K.; et al. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *80*, 407–415. [CrossRef] [PubMed]
31. Tanaka, M.; Fuku, N.; Nishigaki, Y.; Matsuo, H.; Segawa, T.; Watanabe, S.; Kato, K.; Yokoi, K.; Ito, M.; Nozawa, Y.; et al. Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes* **2007**, *56*, 518–521. [CrossRef] [PubMed]
32. Mohlke, K.L.; Jackson, A.U.; Scott, L.J.; Peck, E.C.; Suh, Y.D.; Chines, P.S.; Watanabe, R.M.; Buchanan, T.A.; Conneely, K.N.; Erdos, M.R.; et al. Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Hum. Genet.* **2005**, *118*, 245–254. [CrossRef] [PubMed]
33. Feder, J.; Blech, I.; Ovadia, O.; Amar, S.; Wainstein, J.; Raz, I.; Dadon, S.; Arking, D.E.; Glaser, B.; Mishmar, D. Differences in mtDNA haplogroup distribution among 3 Jewish populations alter susceptibility to T2DM complications. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 198. [CrossRef] [PubMed]

34. Herrnstadt, C.; Elson, J.L.; Fahy, E.; Preston, G.; Turnbull, D.M.; Anderson, C.; Ghosh, S.S.; Olefsky, J.M.; Beal, M.F.; Davis, R.E.; et al. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *70*, 1152–1171. [CrossRef] [PubMed]
35. Kabat, A.; Ponicke, K.; Salameh, A.; Mohr, F.W.; Dhein, S. Effect of a beta 2-adrenoceptor stimulation on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 564–573. [CrossRef] [PubMed]
36. Vinogradov, A.D.; Grivennikova, V.G. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1857*, 863–871. [CrossRef] [PubMed]
37. Yan, L.J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. *J. Diabetes Res.* **2014**, *2014*, 137919. [CrossRef] [PubMed]
38. He, Q.; Wang, M.; Petucci, C.; Gardell, S.J.; Han, X. Rotenone induces reductive stress and triacylglycerol deposition in C2C12 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2749–2755. [CrossRef] [PubMed]
39. Evans, J.L.; Goldfine, I.D.; Maddux, B.A.; Grodsky, G.M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* **2003**, *52*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
40. Shah, S.; Iqbal, M.; Karam, J.; Salifu, M.; McFarlane, S.I. Oxidative stress, glucose metabolism, and the prevention of type 2 diabetes: Pathophysiological insights. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 911–929. [CrossRef] [PubMed]
41. Rocha, M.; Rovira-Llopis, S.; Banuls, C.; Bellod, L.; Falcon, R.; Castello, R.; Morillas, C.; Herance, J.R.; Hernandez-Mijares, A.; Victor, V.M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in insulin resistance. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 5730–5741. [CrossRef] [PubMed]
42. Hou, W.L.; Yin, J.; Alimujiang, M.; Yu, X.Y.; Ai, L.G.; Bao, Y.Q.; Liu, F.; Jia, W.P. Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 1316–1328. [CrossRef] [PubMed]
43. Brunmair, B.; Staniek, K.; Gras, F.; Scharf, N.; Althaym, A.; Clara, R.; Roden, M.; Gnaiger, E.; Nohl, H.; Waldhausl, W.; et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: A common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* **2004**, *53*, 1052–1059. [CrossRef] [PubMed]
44. Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.A.; Beebe, D.; Oates, P.J.; Hammes, H.P.; Giardino, I.; Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **2000**, *404*, 787–790. [CrossRef] [PubMed]
45. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1058–1070. [CrossRef] [PubMed]
46. Singh, D.K.; Winocour, P.; Farrington, K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: Fueling the fire. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 176–184. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



NEWS & VIEWS

Are Mitochondrial Fusion and Fission Impaired in Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients?

Noelia Diaz-Morales,¹ Susana Rovira-Llopis,^{1,2} Celia Bañuls,^{1,2} Irene Escribano-Lopez,¹ Arantxa Martinez de Marañon,¹ Sandra Lopez-Domenech,¹ Samuel Orden,³ Ildfonso Roldan-Torres,⁴ Angeles Alvarez,³ Silvia Veses,¹ Ana Jover,¹ Milagros Rocha,¹⁻³ Antonio Hernandez-Mijares,^{1,2,3,5} and Victor M. Victor^{1-3,6}

Abstract

Mitochondrial fusion/fission alterations have been evaluated in different tissues of type 2 diabetic (T2D) patients. However, it is not known whether mitochondrial dynamics is disturbed in the leukocytes of T2D patients and whether glycemic control affects its regulation. Anthropometric and metabolic parameters in 91 T2D patients (48 with glycosylated hemoglobin [HbA1c] <6.5% and 43 with HbA1c >6.5%) were characteristic of the disease when compared with 78 control subjects. We observed increased reactive oxygen species production in leukocytes from diabetic patients, together with a reduced mitochondrial oxygen consumption rate, especially in poorly controlled patients. Mitochondrial fusion was reduced and fission was increased in diabetic patients, and both features were accentuated in patients with poor glycemic control. Furthermore, leukocyte rolling flux rose in parallel to HbA1c levels. The induction of leukocyte–endothelial interactions in diabetic patients was related to reduced mitochondrial fusion and higher mitochondrial fission. Our findings suggest that mitochondrial dynamics could be influenced by glycemic control in leukocytes of diabetic patients, in which there is decreased mitochondrial fusion and elevated fission related to enhanced leukocyte–endothelial interactions. These findings lead to the hypothesis that poor glycemic control during T2D may alter mitochondrial dynamics and could eventually promote leukocyte–endothelial interactions and the onset of cardiovascular diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 25, 108–115.

Introduction

ADEQUATE GLYCEMIC CONTROL is the key for preventing the cardiovascular complications associated with type 2 diabetes (T2D). Numerous studies suggest that T2D is closely related to mitochondrial dysfunction and oxidative stress (5). Mitochondria form a complex and dynamic network that undergoes continuous cycles of fusion and fission events. This phenomenon, known as mitochondrial dynamics, is a quality control system that is crucial in maintaining a healthy mitochondrial population and also a mechanism of adapta-

tion to cellular energetic demands. The core machinery for mitochondrial fusion and fission processes consists of several dynamin-related GTPases. Proteins involved in mitochondrial fusion include optic atrophy 1 (OPA1) and mitofusins, 1 (MFN1) and 2 (MFN2), and mitochondrial fission is mainly orchestrated by fission protein 1 (FIS1) and dynamin-related protein 1 (DRP1). The fusion process begins when mitofusins anchored to the outer mitochondrial membranes on opposing mitochondria interact with each other, then the outer membranes fuse. Afterward, OPA1 induces inner membrane tethering and fusion. During the fission process, DRP1 forms

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

²Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain.

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

⁴Service of Cardiology, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain.

⁵Department of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

⁶Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

Innovation

Mitochondrial function is altered in type 2 diabetes (T2D), in part, due to altered mitochondrial dynamics. Glycemic control is essential for preventing the T2D-associated cardiovascular complications. However, there are no studies that question whether glycemic control influences mitochondrial dynamics or the impact of these disturbances on the increased leukocyte–endothelium interactions observed in T2D patients. Our results suggest that poor glycemic control may inhibit mitochondrial fusion and enhance mitochondrial fission, highlighting glycemic control in T2D as crucial to maintain a healthy mitochondrial network. These changes in mitochondrial dynamics may promote leukocyte–endothelium contact, favoring the onset of cardiovascular disease.

rings around mitochondria at fission sites, which are favored after FIS1 and DRP1 interaction (9).

Alterations in the mitochondrial fission and fusion machinery are directly associated with mitochondrial dysfunction as fusion is necessary to allow functional mitochondria to complement dysfunctional mitochondria. Furthermore, mitochondrial networks have been reported to permit the transmission of membrane potential from areas of high oxygen availability to those with low oxygen levels to increase ATP production (9). As metabolic diseases are associated with defects in energy production and utilization, and mito-

chondria are the powerhouses of the cell, altered mitochondrial function represents a key pathophysiological feature of metabolic diseases. In this sense, alterations in mitochondrial fusion and fission processes have been detected in different tissues during T2D (3).

The onset of atherosclerosis involves the recruitment of leukocytes to the endothelium that begins when these cells roll over the endothelial cells until coming to a halt, after which they finally adhere firmly. In T2D, a potential role of mitochondrial dynamics in the maintenance of endothelial cell function has been postulated (8). However, leukocyte mitochondrial dynamics has not been evaluated in T2D, nor the influence of glycemic control on this process.

The aim of the current study was to evaluate mitochondrial function and mitochondrial dynamics in leukocytes of T2D patients, considering the degree of glycemic control and comparing it with that in control subjects. In addition, the potential regulation of leukocyte–endothelial interactions by mitochondrial dynamics was evaluated.

Metabolic Parameters

We evaluated 91 T2D patients, divided into two groups according to glycated hemoglobin (HbA1c) levels below and higher than 6.5% ($n=48$, $n=43$, respectively), and compared them with 78 control subjects (Table 1). Diabetic patients exhibited greater weight, body–mass index (BMI), waist circumference, waist-to-hip ratio (WHR), fasting glucose, insulin, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), and HbA1c ($p<0.001$) than controls. Blood

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC PARAMETERS, HYDROCARBONATED METABOLISM PARAMETERS, LIPID PROFILE, AND INFLAMMATORY MARKERS OF THE STUDY POPULATION

	Control	T2D HbA1c <6.5	T2D HbA1c >6.5
<i>n</i>	78	48	43
Male %	44.4	50.0	62.8
Age (years)	57.6 ± 16.0	58.5 ± 8.2	57.8 ± 8.1
Weight (kg)	67.7 ± 12.7	84.7 ± 16.3***	87.0 ± 18.4***
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 3.9	31.8 ± 5.6***	30.8 ± 5.6***
Waist (cm)	87.0 ± 15.2	105.5 ± 12.9***	107.2 ± 13.0***
WHR	0.86 ± 0.11	0.96 ± 0.08***	0.98 ± 0.07***
SBP (mmHg)	123.9 ± 15.6	140.1 ± 14.6***	134.9 ± 16.9**
DBP (mmHg)	73.1 ± 8.8	82.7 ± 8.2***	79.0 ± 7.7**
Glucose (mg/dl)	92.5 ± 13.2	114.7 ± 27.4**	168.2 ± 55.2***†††
Insulin (μUI/ml)	8.65 ± 4.16	12.21 ± 5.66*	16.98 ± 9.70***††
HOMA-IR	2.06 ± 1.28	3.57 ± 2.05**	6.94 ± 4.11***†††
HbA1c (%)	5.30 ± 0.30	6.07 ± 0.43***	8.14 ± 1.32***†††
(mmol/mol)	34.4 ± 3.3	42.8 ± 4.7***	65.4 ± 14.5***†††
Total cholesterol (mg/dl)	202.1 ± 31.9	177.1 ± 32.5***	168.9 ± 42.8***
HDL-c (mg/dl)	52.9 ± 13.0	45.5 ± 11.2**	41.5 ± 8.9***
LDL-c (mg/dl)	129.8 ± 29.3	106.0 ± 31.2***	93.9 ± 34.5***
Triglycerides (mg/dl)	83.5 (63.8; 122.5)	120 (94.0; 167.0)**	134.5 (91.5; 234.0)***
hs-CRP (mg/l)	1.91 (0.56; 3.55)	2.46 (1.35; 7.94)*	3.24 (1.56; 5.36)*

Data are expressed as mean ± standard deviation for parametric data or as median (25th and 75th percentiles) for nonparametric data. Nonparametric data were log transformed for statistic analysis. One-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* test was used to compare means of normally distributed samples. The chi-square test was used to compare proportions among groups.

HOMA-IR = fasting insulin (mU/ml) · fasting glucose (mM)/22.5.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ with regard to controls and †† $p<0.01$ and ††† $p<0.001$ with respect to HbA1c <6.5% group using one-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* test.

T2D, type 2 diabetes; BMI, body–mass index; WHR, waist-to-hip ratio; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; ANOVA, analysis of variance; HSD, honestly significant difference.

pressure was also higher in T2D patients than in controls ($p < 0.01$). T2D patients with poor glycemic control (HbA1c $> 6.5\%$) showed increased glucose and insulin levels with respect to well-controlled T2D patients (HbA1c $< 6.5\%$) ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) and therefore higher HOMA-IR ($p < 0.001$). The lipid profile of diabetic subjects was characterized by higher triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels with respect to controls ($p < 0.001$). However, due to the lipid-lowering treatment received by most of the T2D patients (62.5% were taking statins and 5.8% ezetimibe), levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) were reduced ($p < 0.001$). Inflammation, measured as high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels, was also more pronounced in diabetic patients *versus* controls ($p < 0.05$).

Mitochondrial Function and Oxidative Stress

T2D patients exhibited lower leukocyte O_2 consumption rates than healthy subjects (Fig. 1A, $p < 0.05$). Leukocytes from diabetic patients displayed enhanced levels of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) (Fig. 1B, $p < 0.01$) and total ROS (Fig. 1C, $p < 0.05$).

When evaluated separately according to HbA1c levels below and higher than 6.5%, significant differences were specifically found in the O_2 consumption rates of T2D patients with HbA1c $> 6.5\%$ (Fig. 1D, $p < 0.01$ with respect to controls, $p < 0.05$ between HbA1c $< 6.5\%$ and HbA1c $> 6.5\%$ groups), suggesting that impaired mitochondrial respiration is related to poor glycemic control. Indeed, we found a negative correlation between O_2 consumption and HbA1c levels ($r = -0.317$; $p < 0.05$). However, mitochondrial and total ROS levels in-

creased similarly in both groups of T2D patients regardless of their glycemic control status (Fig. 1E, F).

Fusion and Fission Protein Expression

The expression of MFN1, MFN2, and OPA1, which are implicated in mitochondrial fusion, was downregulated in T2D patients when compared with the control group (Fig. 2A, MFN1 $p < 0.05$; Fig. 2B, MFN2 $p < 0.01$; and Fig. 2C, OPA1 $p < 0.01$).

When data were split by HbA1c, we observed that MFN1 expression was specifically reduced in well-controlled diabetic patients (Fig. 2D, $p < 0.05$), whereas MFN2 levels were specifically reduced in patients with HbA1c $> 6.5\%$ (Fig. 2E, $p < 0.05$). Decreases in the expression of OPA1 were observed in both groups of diabetic patients, being more pronounced in those presenting HbA1c values over 6.5% (Fig. 2F, $p < 0.05$ in patients with HbA1c $< 6.5\%$, and $p < 0.01$ when HbA1c $> 6.5\%$).

Regarding fission proteins, we found higher expression of FIS1 when T2D patients were compared with controls and a similar expression of DRP1 in T2D and control subjects (Fig. 3A, FIS1 $p < 0.05$; and Fig. 3B, DRP1). The differences found in FIS1 seemed to be due to an increase in its expression in the patients with HbA1c $> 6.5\%$ (Fig. 3C, $p < 0.05$). Although DRP1 protein levels were increased in patients with HbA1c $> 6.5\%$, there were no statistical differences between groups (Fig. 3D).

Leukocyte–Endothelium Interactions

When leukocyte–endothelium interactions were assessed in controls and T2D patients, we observed a decrease in

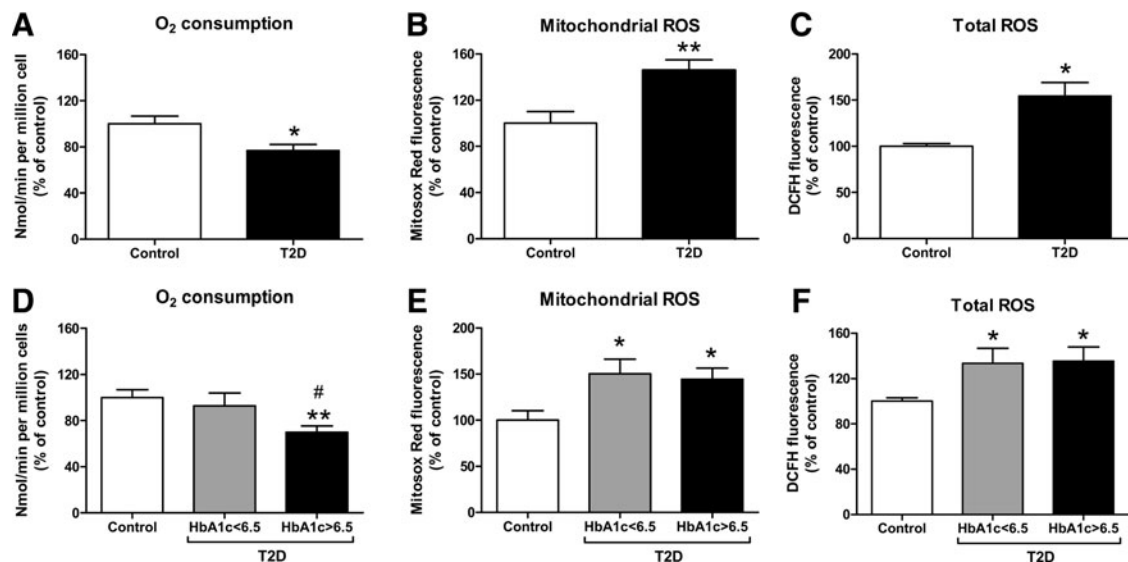


FIG. 1. Mitochondrial function and oxidative stress in T2D patients compared with healthy subjects. $n = 20$ subjects per group. (A) Leukocyte O_2 consumption rates (measured as nmol/min per million cell and expressed as percentage of control). (B) Mitochondrial ROS production (measured as Mitoxox Red fluorescence and expressed as percentage of control). (C) Total ROS production (measured as DCFH fluorescence and expressed as percentage of control). Effects of HbA1c levels on (D) O_2 consumption, (E) mitochondrial ROS, and (F) total ROS in well-controlled T2D patients (HbA1c $< 6.5\%$), poorly controlled T2D patients (HbA1c $> 6.5\%$), and healthy subjects. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ with regard to controls and # $p < 0.05$ with regard to HbA1c $< 6.5\%$ T2D patients using Student's *t*-test or one-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* test. ANOVA, analysis of variance; DCFH, dichlorodihydrofluorescein; HSD, honestly significant difference; ROS, reactive oxygen species; T2D, type 2 diabetes.

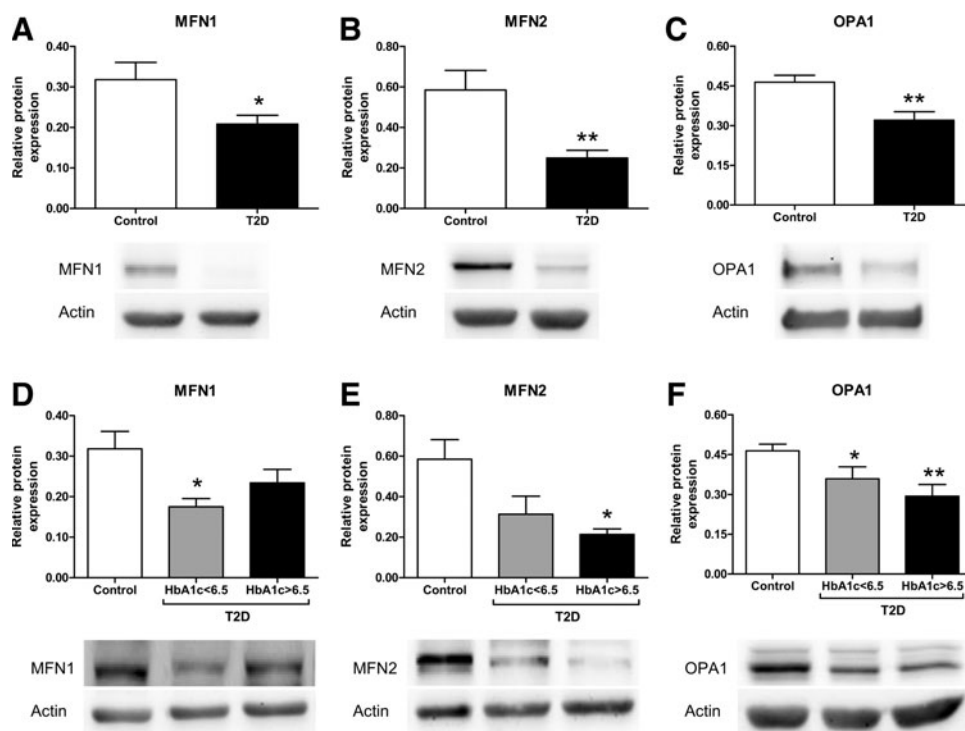


FIG. 2. Effect of T2D on mitochondrial fusion. $n = 15$ subjects per group. (A) Protein levels of MFN1 and representative WB images of MFN1 and actin in T2D and healthy subjects. (B) Protein levels of MFN2 and representative WB images of MFN2 and actin in T2D and healthy subjects. (C) Protein levels of OPA1 and representative WB images of OPA1 and actin in T2D and control subjects. Effects of HbA1c level on the protein expression of (D) MFN1, (E) MFN2, and (F) OPA1 in well-controlled T2D patients (HbA1c < 6.5%) and in T2D patients with poor glycemic control (HbA1c > 6.5%) compared with healthy subjects. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ with regard to controls using Student's *t*-test or one-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* test. MFN1, mitofusin 1; MFN2, mitofusin 2; OPA1, optic atrophy 1; WB, Western blot.

leukocyte rolling velocity (Fig. 4A, $p < 0.001$) and an increase in leukocyte rolling flux and adhesion (Fig. 4B, C, $p < 0.001$) in T2D patients.

No significant differences were found in leukocyte rolling velocity between the two diabetic groups when separated by HbA1c levels below and above 6.5% (Fig. 4D). However, patients with higher levels of HbA1c showed higher leukocyte rolling flux than those showing better glycemic control ($p < 0.05$) (Fig. 4E). Leukocyte adhesion to the endothelium was increased similarly in both diabetic groups (Fig. 4F).

Correlations

We explored potential correlations among fusion/fission proteins, anthropometric/biochemical parameters, oxidative stress determinations, and leukocyte-endothelium parameters. We found that HbA1c levels correlated negatively with the fusion proteins, MFN2 and OPA1 ($r = -0.415$, $p < 0.05$; $r = -0.525$, $p < 0.01$, respectively), and positively with FIS1 ($r = 0.342$, $p < 0.05$). Systolic blood pressure (SBP) was positively correlated with FIS1 protein levels ($r = 0.704$, $p < 0.01$). Interestingly, negative correlations were found between mitochondrial O_2 consumption and the fission proteins, FIS1 and DRP1 ($r = -0.571$, $p < 0.01$; $r = -0.441$, $p < 0.05$, respectively).

Leukocyte rolling velocity correlated positively with MFN1 ($r = 0.502$, $p < 0.01$) and OPA1 ($r = 0.487$; $p < 0.05$) and negatively with FIS1 expression ($r = -0.460$, $p < 0.01$). Furthermore, a negative correlation was found between leu-

kocyte adhesion and MFN1 ($r = -0.498$, $p < 0.05$) and DRP1 ($r = -0.391$, $p < 0.05$).

Hyperglycemia causes imbalances in the cellular redox state, inducing vascular complications during T2D. In previous studies, we have shown that mitochondrial dysfunction and ROS production are present in the leukocytes of T2D patients and are enhanced in patients with macro- and microvascular complications (2, 7). In the present study, we confirm that increased mitochondrial and total ROS production occurs in leukocytes of T2D patients and that reduced mitochondrial O_2 consumption is present specifically in those with poor glycemic control (HbA1c > 6.5%), suggesting that leukocyte mitochondrial function is altered during long-term exposure to glucose. Indeed, it has been reported that mitochondrial respiration is inversely correlated with HbA1c levels in diabetic individuals.

Mitochondrial function and redox balance are closely related to mitochondrial dynamics. Defects in the fusion/fission machinery promote alterations in oxidative phosphorylation due to loss of respiratory complex activity, reduced membrane potential, and decreased O_2 consumption (9). Our results indicate that mitochondrial fusion is reduced in the leukocytes of T2D patients as MFN1, MFN2, and OPA1 protein levels are decreased. Intriguingly, MFN2 protein levels fell specifically in poorly controlled patients and OPA1 levels seemed to drop even further in this group. Moreover, we found a negative correlation between HbA1c and MFN2/OPA1 protein levels, which indicates that loss of glycemic control could inhibit mitochondrial fusion.

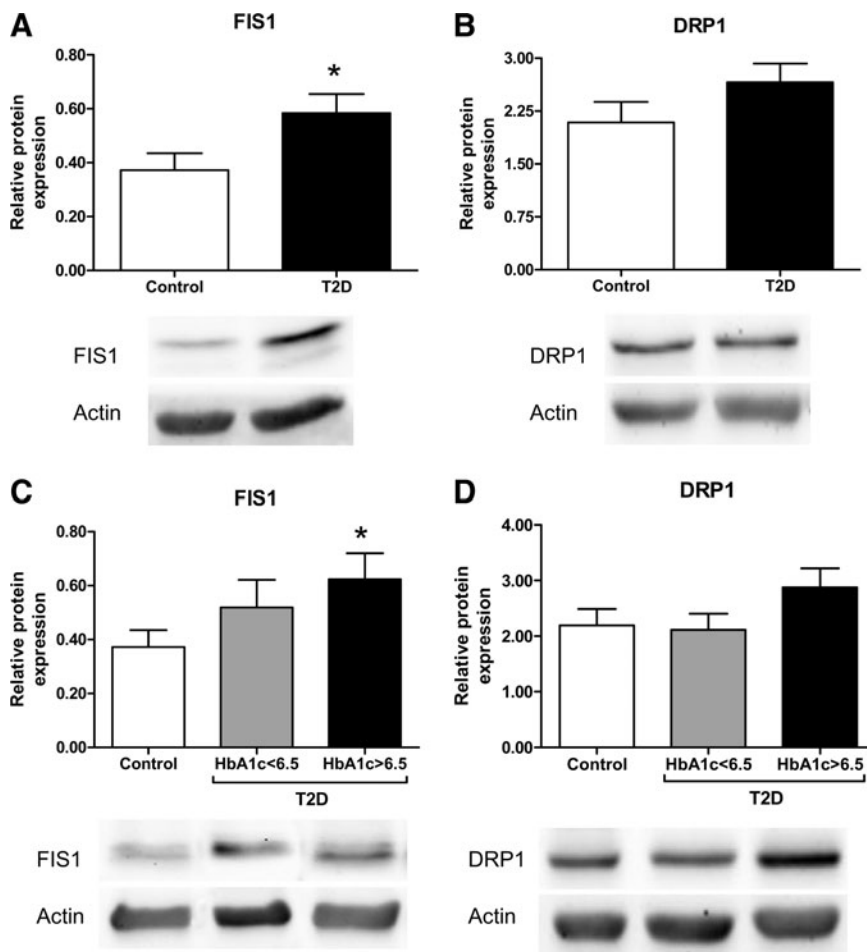


FIG. 3. Evaluation of the relative protein expression of mitochondrial fission markers in T2D patients and healthy subjects. $n = 15$ subjects per group. (A) Protein levels of FIS1 and representative WB images of FIS1 and actin in T2D and healthy subjects. (B) Protein levels of DRP1 and representative WB images of DRP1 and actin in T2D and healthy subjects. Effect of HbA1c levels on the protein expression of (C) FIS1 and (D) DRP1 in well-controlled T2D patients (HbA1c < 6.5%) and in T2D patients with poor glycemic control (HbA1c > 6.5%) compared with healthy subjects. * $p < 0.05$ with regard to controls using Student's *t*-test or one-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* test. DRP1, dynamin-related protein 1; FIS1, fission protein 1.

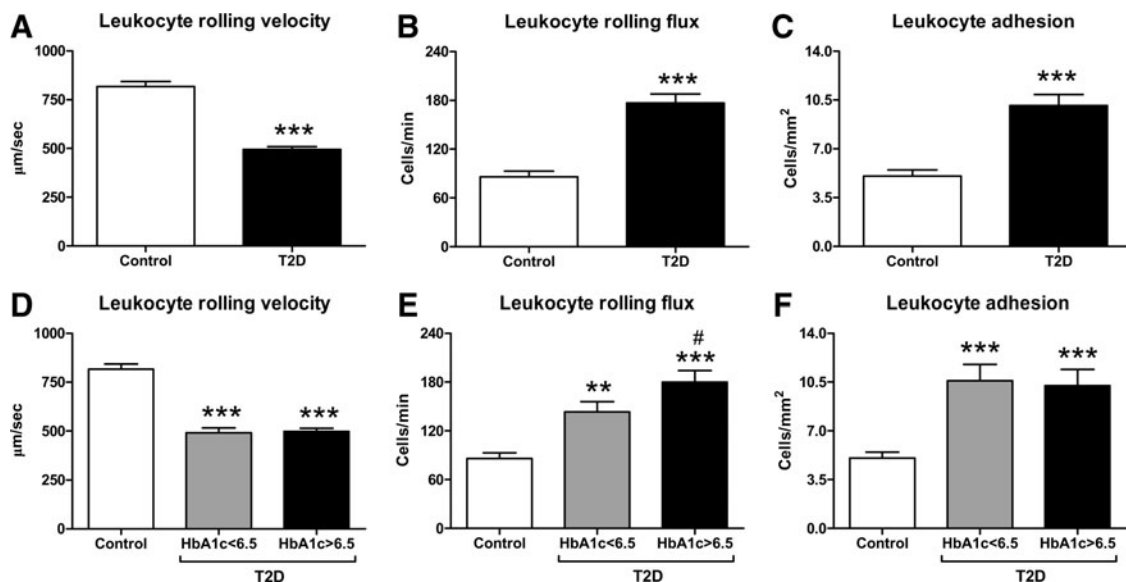


FIG. 4. Evaluation of leukocyte-endothelium interactions in T2D patients and healthy subjects. $n = 30$ subjects per group. (A) Leukocyte rolling velocity (measured as $\mu\text{m}/\text{s}$); (B) leukocyte rolling flux (expressed as cells/min); (C) leukocyte adhesion (measured as cells/ mm^2). Effects of HbA1c levels on leukocyte rolling velocity (D), rolling flux (E), and adhesion (F) in well-controlled T2D patients (HbA1c < 6.5%) and in T2D patients with poor glycemic control (HbA1c > 6.5%) compared with healthy subjects. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ with regard to controls and # $p < 0.05$ with regard to HbA1c < 6.5% T2D patients using Student's *t*-test or one-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* test.

Previous research has revealed that MFN2 protein and mRNA expression in the skeletal muscle of T2D patients is reduced and is related to insulin resistance (1). Besides its role in mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation, MFN2 is involved in Ca^{2+} signaling, amplification of apoptotic signals, and the control of endoplasmic reticulum (ER) morphology. In addition, disturbances in MFN2 expression can also alter ER homeostasis and promote ER stress. In this sense, Ngoh *et al.* showed that MFN2 is essential to the proper temporal sequence of the ER stress response and that loss of Mfn2 causes upregulation of the proapoptotic factor, C/EBP homologous protein (CHOP) (4). Our present results are in accordance with these findings since we observed reduced levels of MFN2 in T2D patients with poor glycemic control, while in a previous cohort of T2D patients, the poorly controlled population displayed enhanced CHOP mRNA and protein expression levels (6). Furthermore, OPA1, the main orchestrator of inner mitochondrial membrane fusion, was reduced in parallel to HbA1c levels in our T2D population, with a strong negative correlation between OPA1 and HbA1c levels, thus suggesting that mitochondrial fusion is compromised during T2D, especially when patients are poorly controlled, and highlighting that glycemic control in T2D is crucial to maintain a healthy mitochondrial network.

Regarding the process of mitochondrial fission, we observed an increase of FIS1 protein levels in the leukocytes of T2D patients, again specifically in poorly controlled T2D individuals. DRP1 levels increase in the HbA1c >6.5% T2D group, although not significantly. These results indicate that in addition to the inhibition of mitochondrial fusion during T2D, mitochondrial fission is enhanced and chronic hyperglycemia worsens this situation. In this context, an increase in mitochondrial fission has been described in other types of cells under hyperglycemia, such as podocytes and endothelial cells.

We have previously reported that leukocyte–endothelial interactions in T2D patients are increased and that HbA1c levels, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and ER stress are positively correlated with these increases (2, 6, 7). The present study widens our perspective by revealing a direct relationship between enhanced leukocyte–endothelium interactions and altered mitochondrial dynamics, namely reduced mitochondrial fusion and increased fission. Since ER stress and mitochondrial fusion/fission alterations are closely related, we believe that these molecular mechanisms are disturbed in T2D, probably as a consequence of chronic hyperglycemia, as they are enhanced during poor glycemic control. Consequently, leukocytes interact more frequently with the endothelium, which is likely to be a consequence of an increase in adhesion molecule expression on their surface. In addition, we found that enhanced mitochondrial fission positively correlated with SBP, a cardiovascular risk factor, in our T2D population. We hypothesize that changes in mitochondrial dynamics related to T2D promote leukocyte recruitment to vascular walls, eventually favoring the onset of cardiovascular diseases (CVDs). Further research is needed to clarify the potential relationship between abnormal mitochondrial fusion/fission processes and cardiovascular complications of T2D such as myocardial ischemia or peripheral artery disease, among others.

Whether glycemic control influences mitochondrial dynamics is a question that has never been addressed before. Herein, we provide evidence that poorly controlled diabetes represses mitochondrial fusion and promotes mitochondrial

fission. These disturbances are accompanied by mitochondrial dysfunction and oxidative stress, all of which influence leukocyte–endothelial interactions. Overall, our findings suggest that mitochondrial dysfunction and altered mitochondrial dynamics in leukocytes during T2D exacerbate leukocyte–endothelium contact. Furthermore, they point to the possibility that poor glycemic control of the disease enhances these processes and can accelerate the onset of CVD.

Notes

Subjects

Ninety-one T2D patients attending the Endocrinology and Nutrition Service of the University Hospital Doctor Peset (Valencia, Spain) and 78 voluntary controls adjusted by age and sex were enrolled in this study. T2D was diagnosed according to the American Diabetes Association's criteria. Subjects with any of the following conditions were excluded from the study: autoimmune disease; history of CVD (including ischemic heart disease, peripheral vascular disease, stroke, and chronic disease related to cardiovascular risk); presence of morbid obesity; or infectious, hematological, malignant, organic, or inflammatory disease; and insulin treatment. Diabetic patients were separated according to HbA1c levels below and above 6.5%. This cutoff point has been established in our hospital's Endocrinology Department based on the distribution of HbA1c levels for patients in our clinical setting (University Hospital Dr. Peset, Valencia, Spain). In accordance with the American Diabetes Association, 6.5% cutoff point is associated with an inflection point for microvascular complications of diabetes.

The study protocols were approved by the Ethics Committee of the University Hospital Doctor Peset and conducted according to the Helsinki Declaration. All participants underwent the process of informed consent required by these institutions.

Blood samples were collected in fasting conditions between 8 a.m. and 10 a.m. Subjects underwent an anthropometric and analytical assessment, in which height (m), weight (kg), BMI (kg/m^2), waist and hip circumference (cm), and systolic and diastolic blood pressure (SBP/DBP; mmHg) were measured.

Biochemical determinations

Venous blood was collected from the antecubital vein and centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C. By means of an enzymatic method, levels of glucose, total cholesterol, and triglycerides were determined in serum. HDL-c levels were obtained using a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp.) and LDL-c content was calculated with Friedewald's formula. Insulin levels were determined by immunochemiluminescence, and insulin resistance was estimated using $HOMA-IR = [fasting\ insulin\ (\mu U/ml) \times fasting\ glucose\ (mg/dl)]/405$. The percentage of HbA1c was determined with an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkray, Inc.) and hs-CRP levels were assessed by an immunonephelometric assay.

Cell isolation

Leukocytes were isolated from citrated blood samples that were incubated with dextran (3%) for 45 min. Supernatant was collected, placed over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), and spun at 650 g for 25 min at room temperature. Erythrocytes

remaining in the pellet were lysed with lysis buffer for 5 min at room temperature and centrifuged at 240 *g*. The leukocyte pellet was then washed and resuspended in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich). Cells were counted with a Scepter 2.0 cell counter (Millipore Iberica).

Measurement of O₂ consumption and ROS production

Leukocyte suspensions were placed in a gas tight chamber and O₂ consumption was measured with a Clark-type O₂ electrode (Rank Brothers) (6). Sodium cyanide (10⁻³ M) was used to evaluate whether or not O₂ consumption was mainly mitochondrial (95–99%). The rate of O₂ consumption was calculated as nmol/min per million cells and expressed as a percentage of the control.

ROS production was assessed by fluorometry using a fluorescence microscope (IX81; Olympus) coupled with the static cytometry software, ScanR (Olympus). Total ROS production was measured in leukocytes incubated for 30 min with the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe (5 × 10⁻⁶ M), and mitochondrial superoxide was detected with the fluorescent probe, MitoSOX (5 × 10⁻⁶ M, 30 min). Nuclei were visualized with Hoechst 33342. Measures of fluorescence are referred to % of control.

Western blot analysis

Leukocytes were lysed on ice for 15 min with cell lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 0.1 mM EDTA, 10 μM Na₂MoO₄, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol), and protein extraction was performed in the presence of a protease inhibitor mixture (10 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 10 mM PNP, 10 mM β-glycerolphosphate). Protein concentrations were determined by a BCA protein assay (Thermo Scientific) after 15 min of centrifugation. Protein samples (25 μg) were resolved on 4–20% Mini-Protean[®] TGX Stain-Free[™] gels (Bio-Rad) and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The primary antibodies used were anti-MFN1 (Millipore Iberica), anti-MFN2 (Millipore Iberica), anti-OPA1 (Millipore Iberica), anti-FIS1 (Millipore Iberica), anti-DRP1 (Abcam), and anti-actin (Sigma Aldrich). Blots were incubated with the secondary antibodies, horseradish peroxidase (HRP) goat anti-mouse (Thermo Scientific) and HRP goat anti-rabbit (Millipore Iberica), and were developed for 2 min with ECL plus reagent (GE Healthcare) or Supersignal West Femto (Thermo Scientific). Visualization was by means of a Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat). The signals were analyzed and quantified by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat).

Leukocyte–endothelium interaction assay

Adhesion assays under flow conditions were carried out using a parallel plate flow chamber *in vitro* model as previously described (6). We employed coverslips with confluent human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) monolayers to perform the adhesion assays. These coverslips were inserted in the bottom plate of the flow chamber so that a 5 × 25 mm portion of the endothelial cells was exposed, and the flow chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S) connected to a camera. Leukocyte suspensions were drawn across the HUVEC monolayer at a flow

rate of 0.36 ml/min. Real-time microscopic images of the flow-exposed monolayer were recorded for 5 min and examined. Leukocyte rolling velocity, flux, and adhesion were calculated as described elsewhere (6). Tumor necrosis factor alpha (10 ng/ml, 4 h) was used as a positive control for HUVECs and platelet-activating factor (1 μM, 1 h) for leukocytes.

Data analysis

The data were collected and managed using SPSS 17.0. To compare controls and T2D patients, data were analyzed by unpaired Student's *t*-test. TG and hs-CRP were normalized by log transformation before analysis. Chi-square was employed to compare proportions. We also evaluated the T2D population divided by HbA1c percentages below and above 6.5% by means of one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's honestly significant difference *post hoc* test. Correlations were calculated using Pearson's correlation coefficient. Values in Table 1 are reported as mean ± standard deviation for parametric data and median and 25th and 75th percentiles for nonparametric data. In graphs, data are expressed as mean ± standard error of the mean. In all tests, *p*-values <0.05 were considered to be significant.

Acknowledgments

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia) for his editorial assistance. This study was financed by grants, PI13/01025, PI13/00073, PI15/01424 CIBERehd CB06/04/0071, PROMETEOII 2014/035, UGP-14-93, and UGP-14-95, and by the European Regional Development Fund (ERDF "A way to build Europe"). 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). N.D.-M. and S.L.-D. are recipients of a predoctoral fellowship from the Carlos III Health Institute (FI14/00125 and FI14/00350, respectively). C.B. is recipient of a postdoctoral contract from the Carlos III Health Institute (CD14/00043).

References

- Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, and Zorzano A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor α and interleukin-6. *Diabetes* 54: 2685–2693, 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.
- Montaigne D, Marechal X, Coisne A, Debry N, Modine T, Fayad G, Potelle C, El Arid JM, Mouton S, Sebti Y, Duez H, Preau S, Remy-Jouet I, Zerimech F, Koussa M, Richard V, Neviere R, Edme JL, Lefebvre P, and Staels B. Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* 130: 554–564, 2014.

4. Ngoh GA, Papanicolaou KN, and Walsh K. Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 287: 20321–20332, 2012.
5. Patti M-E and Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31: 364–395, 2010.
6. 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.
7. Rovira-Llopis S, Rocha M, Falcon R, de Pablo C, Alvarez A, Jover A, Hernandez-Mijares A, and Victor VM. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid Redox Signal* 19: 1452–1458, 2013.
8. Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, Hamburg NM, Frame AA, Caiano TL, Kluge MA, Duess MA, Levit A, Kim B, Hartman ML, Joseph L, Shirihai OS, and Vita JA. Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124: 444–453, 2011.
9. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872–884, 2010.

Date of first submission to ARS Central, March 26, 2016; date of acceptance, April 4, 2016.

Abbreviations Used

ANOVA = analysis of variance
 BMI = body-mass index
 CHOP = C/EBP homologous protein
 CVD = cardiovascular diseases
 DBP = diastolic blood pressure
 DCFH-DA = dichlorodihydrofluorescein diacetate
 DRP1 = dynamin-related protein 1
 ER = endoplasmic reticulum
 FIS1 = fission protein 1
 HbA1c = glycated hemoglobin
 HDL-c = high-density lipoprotein cholesterol
 HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance
 HRP = horseradish peroxidase
 hs-CRP = high-sensitive C-reactive protein
 HSD = honestly significant difference
 HUVEC = human umbilical vein endothelial cells
 LDL-c = low-density lipoprotein cholesterol
 MFN1 = mitofusin 1
 MFN2 = mitofusin 2
 OPA1 = optic atrophy 1
 ROS = reactive oxygen species
 SBP = systolic blood pressure
 T2D = type 2 diabetes
 WB = Western blot
 WHR = waist-to-hip ratio

Address correspondence to:

Dr. Victor M. Victor
 Service of Endocrinology
 FISABIO
 University Hospital Doctor Peset
 Avda Gaspar Aguilar 90
 Valencia 46017
 Spain
 E-mail: victor.victor@uv.es



NEWS & VIEWS

Does Metformin Protect Diabetic Patients from Oxidative Stress and Leukocyte-Endothelium Interactions?

Noelia Diaz-Morales,¹ Susana Rovira-Llopis,¹ Celia Bañuls,¹ Sandra Lopez-Domenech,¹ Irene Escribano-Lopez,¹ Silvia Veses,¹ Ana Jover,¹ Milagros Rocha,^{1,2} Antonio Hernandez-Mijares,^{1,3} and Victor M. Victor^{1,2,4}

Abstract

Since metformin can exert beneficial vascular effects, we aimed at studying its effect on reactive oxygen species (ROS) production, antioxidant enzyme expression, levels of adhesion molecules, and leukocyte-endothelium interactions in the leukocytes from type 2 diabetic (T2D) patients. The study was carried out in 72 T2D patients (41 of whom were treated with metformin for at least 12 months at a dose of 1700 mg per day), and in 40 sex- and age-matched control subjects. Leukocytes from T2D patients exhibited enhanced levels of mitochondrial ROS and decreased mRNA levels of glutathione peroxidase 1 (*gpx1*) and sirtuin 3 (*sirt3*) with respect to controls, whereas metformin was shown to revert these effects. No changes were observed on total ROS production and the expression levels of superoxide dismutase 1 and catalase. Furthermore, increases in leukocyte-endothelial interactions and intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin levels were found in T2D and were also restored in metformin-treated patients. Our findings raise the question of whether metformin could modulate the appearance of atherosclerosis in T2D patients and reduce vascular events by decreasing leukocyte oxidative stress through an increase in *gpx1* and *sirt3* expression, and undermining adhesion molecule levels and leukocyte-endothelium interactions. *Antioxid. Redox Signal.* 27, 1439–1445.

Keywords: metformin, type 2 diabetes, oxidative stress, leukocyte-endothelium interactions, mitochondria, atherosclerosis

Introduction

TYPE 2 DIABETES (T2D) has become one of the most important health concerns in developed countries. Although insulin resistance (IR) is the central causal process of T2D, the mechanisms relating IR and T2D are not yet fully understood. T2D is also associated with an enhanced infiltration of leukocytes and an exacerbated oxidative stress (1, 8).

Oxidative stress occurs when the balance between reactive oxygen species (ROS) production and the antioxidant system capacity is disrupted. ROS production plays a key role in the etiology of IR in the leukocytes of diabetic patients (4). Moreover, antioxidant enzymes such as superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (GPX1), and sirtuin 3 (SIRT3), which are

Innovation

Metformin is known to exert beneficial effects on the vasculature. However, there are no studies that question the impact of this drug on the interactions between leukocytes and endothelium in type 2 diabetic patients, a key step in the beginning of the atherosclerotic process. The present study suggests that metformin can modulate the development of atherosclerosis by reducing mitochondrial impairment, adhesion molecule expression, and leukocyte-endothelium contact. In this way, metformin could potentially prevent the onset of atherosclerosis and, hence, cardiovascular disease.

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

²CIBERehd—Department of Pharmacology, University of Valencia, Valencia, Spain.
 Departments of ³Medicine and ⁴Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

needed for detoxifying the reactive intermediates, have been seen to be modified in T2D.

During the development of T2D, a low-grade systemic inflammatory response occurs due, at least in part, to hyperglycemic effects on different tissues and cells such as white blood cells (8). The nuclear transcription factor NF- κ B is activated under these conditions, especially when there is IR. In this chronic inflammatory state, inflammatory cells such as leukocytes can be damaged by hyperglycemia, and these actions increase the risk of infection by undermining innate immune function.

T2D patients have shown a high prevalence of endothelial dysfunction, which is a crucial feature of the initiation of the atherosclerotic process and is related to IR and cardiovascular disease. In the early stages of atherosclerosis, activated leukocytes roll along the wall of these inflamed vessels and finally adhere and transmigrate. Endothelial recruitment of leukocytes is mediated by adhesion molecules that are expressed on either endothelial or white blood cells. Adhesion molecules that are implicated in the atherogenic process include intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and selectins.

Metformin, a biguanide that acts as an insulin sensitizer, has long been used in the treatment of T2D due to its glucose-lowering properties. This drug increases insulin-stimulated

glucose uptake in adipocytes and skeletal muscle, thus reducing hyperglycemia and improving IR. Metformin has been described to exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects in T2D patients (7). Moreover, it improves endothelial function in patients with T2D or metabolic syndrome (5).

Different studies have highlighted the importance of hyperglycemia and IR in enhanced ROS production by peripheral blood leukocytes, the decrease of antioxidant enzyme activities, the increase of proinflammatory cytokines, and a rise in the number of leukocyte-endothelium interactions (1, 4, 8). Nevertheless, we wonder whether metformin treatment protects T2D patient leukocytes from oxidative stress by regulating ROS production and antioxidant enzyme expression, and whether this drug modulates leukocyte-endothelium interactions and adhesion molecule expression in T2D patients.

Results

Anthropometric and metabolic parameters

The present study analyzed 40 healthy subjects and 72 T2D patients (41 of whom were taking metformin as their main antidiabetic treatment and 31 of whom were treated with other oral antidiabetic drugs or were drug naïve). Anthropometric and metabolic characteristics of the study population are shown in Table 1. No statistical significances

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC AND METABOLIC CHARACTERISTICS OF THE POPULATION

	<i>Control</i>	<i>T2D without metformin</i>	<i>T2D with metformin</i>	p	<i>BMI-adjusted p-value</i>
<i>n</i>	40	31	41		
Male%	42.5	54.8	53.7	ns	
Age (years)	55.9 ± 6.6	58.3 ± 9.6	54.6 ± 5.3	ns	
Weight (kg)	73.5 ± 20.0	83.1 ± 15.8*	92.0 ± 18.08***	<0.001	
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 5.1	31.0 ± 5.1**	33.4 ± 5.7***	<0.001	
Waist circumference (cm)	85.9 ± 14.8	102.9 ± 13.6***	110.6 ± 13.3***#	<0.001	
SBP (mmHg)	125.0 ± 22.5	138.1 ± 12.0*	134.1 ± 15.4*	<0.05	ns
DBP (mmHg)	76.1 ± 11.4	82.9 ± 11.4	80.8 ± 8.5	ns	ns
Glucose (mg/dl)	94.3 ± 11.0	134.9 ± 51.8***	136.8 ± 45.7***	<0.001	<0.001
Insulin (μ UI/ml)	8.1 ± 4.2	11.7 ± 3.4*	14.3 ± 6.2***	<0.001	<0.001
HOMA-IR	1.94 ± 1.2	3.71 ± 2.2*	4.86 ± 2.4***	<0.001	<0.001
HbA1c (%)	5.40 ± 0.4	6.83 ± 1.0***	6.81 ± 1.4***	<0.001	<0.001
Total cholesterol (mg/dl)	207.3 ± 35.6	171.3 ± 34.8***	172.9 ± 34.4***	<0.001	<0.001
HDL-c (mg/dl)	58.4 ± 21.3	45.5 ± 12.4***	43.1 ± 9.6***	<0.001	<0.05
LDL-c (mg/dl)	128.5 ± 28.6	101.8 ± 33.6***	98.4 ± 28.1***	<0.001	<0.001
Triglycerides (mg/dl)	104.0 (64.0–158.0)	108.0 (68.0–160.0)	133.9 (93.5–185.5)	ns	ns
hs-CRP (mg/l)	0.75 (0.36–1.58)	2.98 (1.97–6.72)***	3.17 (1.72–6.92)***	<0.001	ns
<i>Treatment (%)</i>					
Statins		48.4	56.1	ns	
Fibrate		12.9	14.6	ns	
Ezetimibe		6.5	0	ns	
DPP-4 inhibitors		25.8	39.0	ns	
Glitazones		0	4.9	ns	
Glinides		3.2	9.8	ns	
GLP-1 agonists		9.7	17.1	ns	

Values are expressed as mean ± standard deviation for parametric data, and median (25th–75th percentiles). For parametric data, comparisons between groups were made with one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple-comparison *post hoc* test; nonparametric data were compared by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Proportions between groups were compared by the chi-square test. Analysis of covariance was performed with a univariate general linear model by using BMI as a covariate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ with respect to control; # $p < 0.05$ with respect to non-metformin-treated T2D.

ANOVA, analysis of variance; BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; DPP-4, dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, 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.

were observed among the groups with respect to percentage of men, age, and diastolic blood pressure (DBP). Both T2D groups of patients had a higher weight ($p < 0.05$ in T2D without metformin and $p < 0.001$ in T2D with metformin), body mass index (BMI) ($p < 0.01$ in T2D without metformin and $p < 0.001$ in T2D with metformin), waist circumference ($p < 0.001$ in both T2D groups), and systolic blood pressure (SBP) ($p < 0.05$ for both T2D groups) than control subjects, and patients treated with metformin had higher waist circumference than those not treated with metformin ($p < 0.05$). Analysis of glucose metabolism revealed an increase in fasting glucose levels ($p < 0.001$ in both T2D groups), fasting insulin levels ($p < 0.05$ in T2D without metformin and $p < 0.001$ in T2D with metformin), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) ($p < 0.05$ in T2D without metformin and $p < 0.001$ in T2D with metformin), and HbA1c ($p < 0.001$ in both T2D groups) with respect to controls. The lipid profile of T2D patients showed lower levels of total, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) ($p < 0.001$ in both groups) than in controls. No significant differences in the levels of triglycerides were found between groups. T2D patients exhibited higher levels of C-reactive protein (CRP, $p < 0.001$ for both groups) than control subjects.

As T2D patients had a higher BMI than controls, the data were adjusted for BMI. Nevertheless, the differences between groups remained, with the exception of those of SBP and CRP, which were no longer significant.

Oxidative stress

Total and mitochondrial ROS production, as well as the mRNA expression levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase 1 (*sod1*), catalase (*cat*), glutathione peroxidase 1 (*gpx1*), and sirtuin 3 (*sirt3*) were measured to assess oxidative stress in the leukocytes of the studied subjects, and these are shown in Figure 1. Both metformin- and non-metformin-treated T2D patients showed higher levels of total ROS than control subjects ($p < 0.05$, Fig. 1A). In addition, an increase in mitochondrial ROS production was observed in both groups of T2D patients ($p < 0.001$ in non-metformin-treated group, and $p < 0.05$ in metformin-treated group, Fig. 1B) with respect to controls; however, patients treated with metformin presented statistically significant lower levels of mitochondrial ROS than those not treated with the drug ($p < 0.001$, Fig. 1B). Regarding antioxidant enzymes, the expression of *gpx1* and *sirt3* was reduced in non-metformin-treated T2D patients with respect to control subjects ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, Fig. 1E, F); interestingly, those metformin-treated T2D patients presented significantly higher expression levels of both antioxidant enzymes when compared with the metformin-treated group ($p < 0.01$). No significant differences were found in the expression of *sod1* and *cat* between T2D patients and the control group (Fig. 1C, D).

Leukocyte-endothelium interactions

Non-metformin-treated T2D patients displayed reduced levels of leukocyte rolling velocity ($p < 0.001$, Fig. 2A) and enhanced levels of leukocyte rolling flux and adhesion ($p < 0.001$, Fig. 2B, C, respectively) with respect to control subjects. Interestingly, leukocyte rolling velocity was increased ($p < 0.05$, Fig. 2A) and rolling flux ($p < 0.001$) and

adhesion ($p < 0.01$) decreased in metformin-treated patients with respect to non-metformin-treated subjects.

Adhesion molecules

The adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and P-Selectin were measured to determine a possible mechanism by which metformin treatment reduces leukocyte-endothelium interactions (Fig. 3). Non-metformin-treated T2D patients showed a peak in the levels of ICAM-1 ($p < 0.01$, Fig. 3A) and P-Selectin ($p < 0.05$, Fig. 3C) when compared with controls. Metformin reduced ICAM-1 levels (Fig. 3A, $p < 0.05$), and a downward trend was observed in the levels of P-selectin (Fig. 3C, $p = 0.08$) in metformin-treated patients with respect to those not receiving the drug. No significant differences were found in serum levels of VCAM-1 among the three study groups (Fig. 3B).

Discussion

The present study has evaluated the effects of metformin treatment on total ROS production, mitochondrial ROS, mRNA expression levels of *sod1*, *cat*, *gpx1*, and *sirt3*, leukocyte-endothelium interactions, and adhesion molecules in T2D patients. Metformin- and non-metformin-treated T2D patients showed similar glycemic status, as manifested by HbA1c levels.

We show that metformin-treated T2D patients exhibit a decrease in mitochondrial ROS production, an increase in mRNA expression levels of *gpx1* and *sirt3*, and reduced leukocyte-endothelium interactions (reduced leukocyte rolling flux and adhesion, and increased leukocyte rolling velocity), and serum levels of ICAM-1 and P-selectin with respect to non-metformin-treated T2D patients.

T2D is related to different cardiovascular risk factors, such as excess weight and/or obesity, hypertension, hyperglycemia, IR, and dyslipidemia. Metformin has been shown to have beneficial effects by decreasing the progression of T2D in patients with impaired glucose tolerance. This drug has also demonstrated beneficial effects on lipoprotein subfractions by decreasing LDL and reducing the risk of atherogenesis (2). Nevertheless, little is known about the effect of metformin treatment on leukocyte oxidative stress, as well as on the leukocyte-endothelium interactions and adhesion molecule expression in T2D patients.

The atherosclerotic process and oxidative stress are related to leukocyte recruitment to the arterial wall, processes that contribute to the development of vascular diseases. In this line, the aim of the present study was to assess the possible beneficial effects of metformin treatment on the initial steps of the atherosclerotic process in T2D patients by using a model that allows leukocyte-endothelium interactions to be evaluated. This model reproduces the leukocyte rolling and adhesion processes that take place during the *in vivo* inflammatory focus generation. It has been widely employed to study the different steps implicated in interactions between leukocytes and the endothelium, as it allows possible alterations to be detected and potential mechanisms of action to be identified (4).

Our metformin-treated T2D patients showed an improved subclinical atherosclerotic marker profile with respect to patients not treated with metformin, as seen by a significant decrease of oxidative stress (reduced mitochondrial ROS levels, probably as a consequence of increased expression of antioxidant enzymes *gpx1* and *sirt3*), leukocyte-endothelium

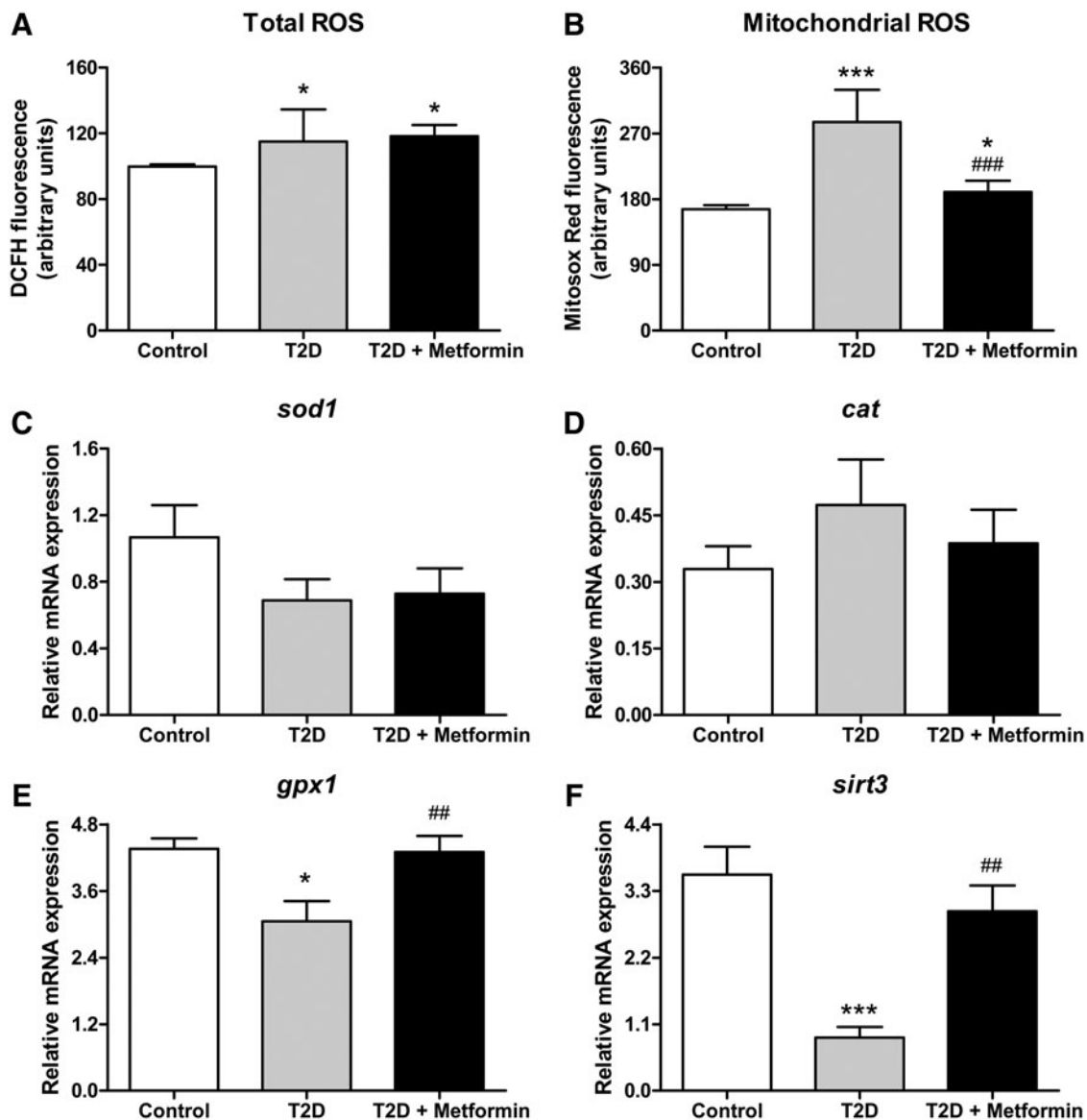


FIG. 1. Evaluation of oxidative stress (ROS production and mRNA expression of antioxidant enzymes) in T2D patients with and without metformin treatment and healthy control subjects. $n = 15$ samples per group. (A) Total ROS production measured as arbitrary units of DCFH fluorescence. (B) Mitochondrial ROS production measured as arbitrary units of Mitoxox Red fluorescence. Relative mRNA expression of (C) *sod1*, (D) *cat*, (E) *gpx1*, and (F) *sirt3*. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ with respect to control; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ with respect to non-metformin-treated T2D, by using one-way ANOVA with a Student-Newman-Keuls multiple-comparison *post hoc* test. ANOVA, analysis of variance; *cat*, catalase; DCFH, dichlorodihydrofluorescein; *gpx1*, glutathione peroxidase 1; ROS, reactive oxygen species; *sirt3*, sirtuin 3; *sod1*, superoxide dismutase 1; T2D, type 2 diabetes.

interactions, and ICAM-1 serum levels, which, in turn, might prevent the development of an atherogenic process. Furthermore, the adhesion molecule P-selectin, which was increased in the patients not treated with metformin, was also slightly reduced ($p = 0.08$) in the metformin-treated group.

Our results are in accordance with previous studies showing that metformin exerts antioxidant effects by decreasing ROS from different sources, including NAD(P)H oxidase and mitochondria (6). Understanding the mechanisms by which metformin decreases mitochondrial ROS levels is important as ROS are implicated in the pathogenesis of atherosclerotic vascular disease. Our study demonstrates that metformin might exert its beneficial antioxidant mech-

anisms by modulating the expression of *gpx1* and *sirt3*, but not *cat* or *sod1*. SIRT3 is an NAD⁺-dependent deacetylase specifically located in the mitochondria that, when over-expressed, reduces ROS production in several tissues. For this reason, we postulate that metformin might enhance the mRNA expression of *sirt3*, leading to a reduction of mitochondrial ROS production. At the same time, this drug might also increase the expression of the cytoplasmic selenoprotein *gpx1*, thus protecting leukocytes against oxidative stress by a reduction of hydroperoxides.

Metformin has been postulated to contribute to endothelial protection in a way that is mediated by improved endothelium-dependent vascular responses (5). This drug has been shown

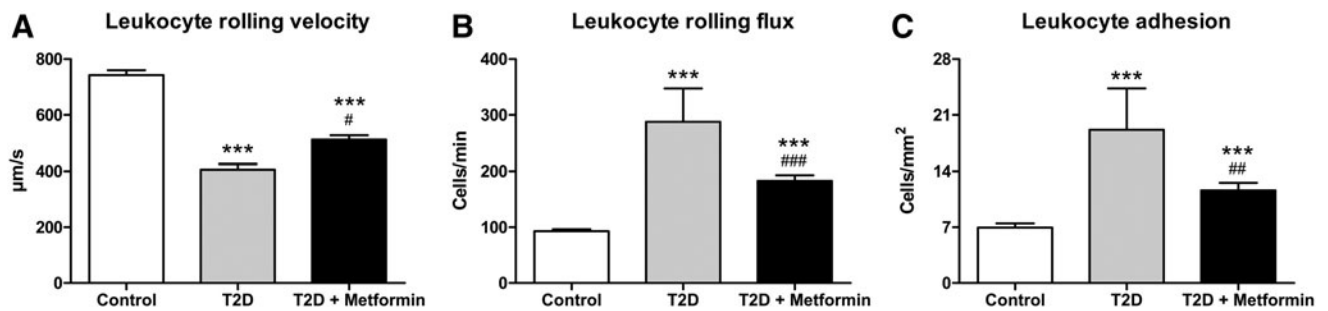


FIG. 2. Assessment of leukocyte-endothelium interactions in T2D patients with and without metformin treatment and healthy control subjects. $n=25$ subjects per group. (A) Leukocyte rolling velocity expressed as $\mu\text{m/s}$. (B) Leukocyte rolling flux measured as cells/min. (C) Leukocyte adhesion expressed as cells/ mm^2 . *** $p<0.001$ with respect to control; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, and ### $p<0.001$ with respect to non-metformin-treated T2D, by using one-way ANOVA with a Student-Newman-Keuls multiple-comparison *post hoc* test.

to reduce/reverse the impact of hyperglycemia on endothelial function in aortic tissue and microvascular endothelial cells by increasing phosphorylation of eNOS and Akt. At the molecular level, a recent study concluded that metformin exerts its cardiovascular protective effect by reducing the activity of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) via the AMP-activated protein kinase (AMPK)-PARP1 cascade (9). All these findings suggest that metformin has beneficial effects by impeding the atherosclerotic process and, consequently, cardiovascular events.

Soluble adhesion molecules, such as E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1, are expressed by endothelial cells and leukocytes in response to inflammation. These molecules are key markers of endothelial activation, as they participate directly in the recruitment of leukocytes to the site of inflammation. In fact, impairment of endothelial activation is related to increased susceptibility to infection and, therefore, morbidity. Several studies have described increased levels of adhesion molecules and proinflammatory cytokines in T2D patients (4, 8). Our data confirm that both P-selectin and ICAM-1 expression levels are upregulated in T2D populations, thus implying an etiological role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of T2D. Interestingly, we have observed that metformin-treated T2D patients present decreased levels of ICAM-1 and slightly declined P-selectin levels ($p=0.08$) with respect to non-metformin-treated T2D subjects, which are in accordance with a reduction in leukocyte-endothelium interactions in the metformin-treated group. In fact, it has been

reported that metformin inhibits the activation of NF- κ B in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) exposed to inflammatory cytokines, thus reducing the expression of genes that encode adhesion and proinflammatory molecules (3).

In conclusion, our data support the beneficial effects of metformin on oxidative stress, endothelial function, and leukocyte-endothelium interactions, which suggest that they might prevent the vascular damage and development of an atherogenic process in T2D. Future studies should evaluate whether treatment with insulin sensitizers, such as metformin, can improve cardiovascular function in T2D.

Notes

Subjects of the study and sample collection

The present work is an observational study of 72 T2D patients recruited at the Endocrinology and Nutrition Department of the University Hospital Doctor Peset (Valencia, Spain) and 40 healthy volunteers. In the diabetic group, 41 patients were taking metformin as their main antidiabetic treatment (at a dose of 1700 mg for at least 12 months) and 31 patients were not taking metformin. All subjects were informed before signing a written consent form, and the protocols followed were approved by the Ethics Committee of the University Hospital Doctor Peset and conducted in accordance with the Helsinki Declaration. T2D was diagnosed by following the American Diabetes Association's criteria (fasting glycemia ≥ 126 mg/dl on at least two

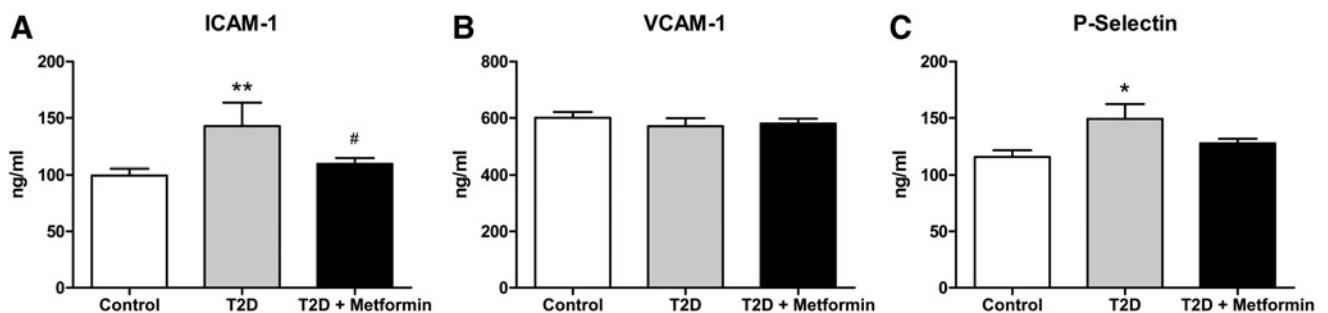


FIG. 3. Evaluation of soluble adhesion molecules in the serum of T2D patients with and without metformin treatment and healthy control subjects. $n=30$ samples per group. (A) ICAM-1 levels, (B) VCAM-1 levels, and (C) P-Selectin levels expressed as ng/ml. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ with respect to control; # $p<0.05$ with respect to non-metformin-treated T2D, by using one-way ANOVA with a Student-Newman-Keuls multiple-comparison *post hoc* test. ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

occasions, or glycemia 2 h after 75 g glucose oral load of ≥ 200 mg/dl, or HbA1c $\geq 6.5\%$). Subjects with any of the following conditions were excluded from the study: autoimmune disease; history of cardiovascular disease (including ischemic heart disease, peripheral vascular disease, stroke, and chronic disease related to cardiovascular risk); presence of morbid obesity; or infectious, hematological, malignant, organic, or inflammatory disease and insulin treatment.

Blood samples were taken in fasting conditions during a routine blood extraction and anthropometric parameters—weight (kg), height (m), waist circumference (cm), and SBP and DBP (mmHg)—were measured.

Biochemical parameters and adhesion molecules

Blood was extracted from the antecubital vein in serum separator tubes and centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C. Serum was collected and analyzed for glucose, total cholesterol, and triglyceride levels by using an enzymatic method. A Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., CA) was employed to quantify HDL-c levels, and Friedewald's formula was used to calculate LDL-c content. Insulin levels were obtained by an immunochemiluminescence assay (Abbott, IL), and HOMA-IR index [fasting insulin (μ U/ml) \times fasting glucose (mg/dl)/405] was calculated to estimate IR. An automatic glycohemoglobin analyzer (Arkay, Inc., Kyoto, Japan) and an immunonephelometric assay were used to determine the percentage of glycated hemoglobin (HbA1c) and the levels of high-sensitive C-reactive protein, respectively. ICAM-1, VCAM-1, and P-Selectin adhesion molecules were measured with XMAP technology by using a Luminex 200 flow analyzer device (Austin, TX).

Leukocyte isolation

Blood samples collected in heparinized tubes were incubated with 1:2 volumes of dextran solution (3% in NaCl 0.9%) (Sigma Aldrich, MO) for 45 min. The supernatant was carefully placed over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and then centrifuged at 650 g for 25 min. Pellets containing leukocytes were incubated with lysis buffer for 5 min to lyse remaining red blood cells and were then centrifuged at 240 g. After discarding supernatants, leukocytes were washed, resuspended in HBSS buffer (Sigma Aldrich, MO), and counted.

ROS production

Isolated leukocytes were incubated with 5 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and MitoSOX fluorescent probes (Thermo Fisher Scientific, MA) for 30 min to measure total ROS and mitochondrial superoxide production, respectively, by using a fluorescence microscope (IX81; Olympus, Hamburg, Germany) coupled with the static cytometry software "ScanR" (Olympus, Hamburg, Germany). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, MO), and results were expressed as % of the control.

mRNA expression levels

The GeneAll® Ribospin™ Total RNA extraction kit (Geneall Biotechnology, Hilden, Germany) was used to obtain total RNA from leukocytes by following the manufacturer's instructions. The amount and purity of RNA was assessed by using a NanoDrop 200c spectrophotometer (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA). One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA by using RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA). RT-qPCRs using 1 μ l of cDNA and the KAPA SYBR FAST universal master mix (KAPA Biosystems, MA) were performed in a 7500 Fast RT-PCR system (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Primer sequences and protocol details are described in Table 2. Relative quantification was performed according to the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method by using Expression Suite software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Leukocyte-endothelium interaction assays

HUVECs were obtained from fresh umbilical cords by treating the veins with collagenase (1 mg/ml in phosphate-buffered saline; Thermo Fisher Scientific, MA) for 17 min. HUVEC primary cultures were grown over fibronectin-coated plastic coverslips (Sigma Aldrich, MO) and incubated with complete EMB-2 culture medium (Lonza, Basel, Switzerland). Once a confluent monolayer had been obtained, the cultures were placed in a flow chamber (Glycotech, MD) so that an area of 5 \times 25 mm was exposed. The flow chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S), and leukocyte suspensions (10^6 cells/ml) were drawn across the HUVEC monolayer (0.36 ml/min) whereas real-time microscope recordings were performed during 5-min periods. The videos were then analyzed and leukocyte rolling velocity, rolling flux, and adhesion were calculated as previously described (4). We used Tumor Necrosis Factor- α (TNF α 10 ng/ml, 4 h; Sigma Aldrich, MO) as a positive control for HUVEC and platelet-activating factor (1 μ M, 1 h; Sigma Aldrich, MO) as a positive control for leukocytes.

Data analysis

The statistics software SPSS 17.0 was employed for data analysis. Values shown in the table are mean \pm standard deviation for parametric data, and median (25th–75th percentiles) for non-parametric data; whereas the bars in the figures are mean \pm standard error of the mean. Comparisons between the three study groups for parametric data were made with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls

TABLE 2. SEQUENCES OF THE PRIMERS USED AND DETAILS OF THE RT-PCR PROTOCOL

Target	Direction	Sequence (5'–3')
<i>Primers</i>		
<i>sod1</i>	Forward	GGTGTGGCCGATGTGTCTAT
	Reverse	TTCCACCTTTGCCCAAGTCA
<i>cat</i>	Forward	CTTCGACCCAAGCAACATGC
	Reverse	CGGTGAGTGTCCAGGATAGGC
<i>gpx1</i>	Forward	TTGAGAAGTTCCTGGTGGGC
	Reverse	CGATGTCAGGCTCGATGTCA
<i>sirt3</i>	Forward	CGGCTCTACACGCAGAACATC
	Reverse	CAGCGGCTCCCCAAAGAACAC
<i>GAPDH</i>	Forward	CGCATCTTCTTTTGCGTCG
	Reverse	TTGAGGTC AATGAAGGGGTCA
<i>Protocol</i>		
Temperature	95°C	95°C 60°C
Time	10 min	10 s 30 s
Number of cycles	1	40

multiple-comparison *post hoc* test, and with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for nonparametric data. Proportions between groups were compared by the chi-square test. The potential influence of BMI on the parameters shown in the table was minimized by an analysis of covariance. Changes in blood pressure, serum lipid, and biochemical parameters were analyzed with an univariate general linear model using BMI as a covariate. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Acknowledgments

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia-CIBERehd) for his editorial assistance; and Rosa Falcon and Carmen Ramirez (FISABIO) for their technical assistance. This study was financed by grants PI15/1424, PI16/1083, PI16/0301, and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute and by the European Regional Development Fund (ERDF "A way to build Europe"); UGP15-193 and UGP15-220 by FISABIO; and GV/2016/169 and PROMETEO 2014/035 by the Department of Education of the Valencian Regional Government. N.D.-M. and S.L.-D. are recipients of PFIS contracts from Carlos III Health Institute (FI14/00125 and FI14/00350, respectively). S.R.-L. is recipient of a Juan de la Cierva-Formación contract from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FJCI-2015-25040). C.B. is recipient of a Sara Borrell contract from Carlos III Health Institute (CD14/00043). I.E.-L. is recipient of a predoctoral contract from FISABIO (UGP-15-144). V.M.V. and M.R. are recipients of contracts from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government and Carlos III Health Institute (CES10/030 and CPII16/00037, respectively).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Banuls C, Escribano-Lopez I, de Maranon AM, Lopez-Domenech S, *et al.* Are mitochondrial fusion and fission impaired in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal* 25: 108–115, 2016.
- Goldberg R, Temprosa M, Otvos J, Brunzell J, Marcovina S, Mather K, *et al.* Lifestyle and metformin treatment favorably influence lipoprotein subfraction distribution in the Diabetes Prevention Program. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 3989–3998, 2013.
- Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, and Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 47: 1183–1188, 2006.
- Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Banuls C, Bellod L, de Pablo C, *et al.* 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.
- Mather KJ, Verma S, and Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 37: 1344–1350, 2001.
- Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, and Beaudeau JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 54: 829–834, 2005.
- Pavlovic D, Kocic R, Kocic G, Jevtovic T, Radenkovic S, Mikic D, *et al.* Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2: 251–256, 2000.
- Rovira-Llopis S, Rocha M, Falcon R, de Pablo C, Alvarez A, Jover A, *et al.* Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid Redox Signal* 19: 1452–1458, 2013.
- Shang F, Zhang J, Li Z, Zhang J, Yin Y, Wang Y, *et al.* Cardiovascular protective effect of metformin and telmisartan: reduction of PARP1 activity via the AMPK-PARP1 cascade. *PLoS One* 11: e0151845, 2016.

Address correspondence to:

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

E-mail: victor.victor@uv.es

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

E-mail: hernandez_antmij@gva.es

Date of first submission to ARS Central, April 21, 2017; date of acceptance, May 1, 2017.

Abbreviation Used

ANOVA	= analysis of variance
BMI	= body mass index
CRP	= C-reactive protein
DBP	= diastolic blood pressure
DCFH-DA	= 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
GPx1	= glutathione peroxidase 1
HbA1c	= glycated hemoglobin
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
ICAM-1	= intercellular adhesion molecule-1
IR	= insulin resistance
LDL-c	= low-density lipoprotein cholesterol
PARP1	= poly (ADP-ribose) polymerase 1
ROS	= reactive oxygen species
SBP	= systolic blood pressure
SOD1	= superoxide dismutase 1
T2D	= type 2 diabetes
TNF α	= tumor necrosis factor- α
VCAM-1	= vascular cell adhesion molecule-1



NEWS & VIEWS

Does Metformin Modulate Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Type 2 Diabetic Peripheral Blood Mononuclear Cells?

Noelia Diaz-Morales,¹ Francesca Iannantuoni,¹ Irene Escribano-Lopez,¹ Celia Bañuls,¹ Susana Rovira-Llopis,¹ Eva Sola,¹ Milagros Rocha,^{1,2} Antonio Hernandez-Mijares,^{1,3,4} and Victor M. Victor^{1,2,5}

Abstract

Since type 2 diabetes (T2D) is associated with oxidative stress and metformin has been shown to exert a protective role against the said stress, we wondered whether metformin treatment might also modulate endoplasmic reticulum (ER) stress and autophagy in leukocytes of T2D patients. We studied 53 T2D patients (37 of whom had been treated with metformin 1700 mg for at least 1 year) and 30 healthy volunteers. Leukocytes from both groups of T2D patients exhibited increased protein levels of 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78) with respect to controls, whereas activating transcription factor 6 (ATF6) was enhanced specifically in nonmetformin-treated T2D, and spliced X-box binding protein 1 (*s-xbp1*) and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α (p-eIF2 α) increased only in the metformin-treated group. The autophagy markers beclin1 (*becn1*), autophagy-related 7 (*atg7*), and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3III/I (LC3 II/I) increased in nonmetformin-treated T2D, and metformin treatment reduced mitochondrial superoxide and increased glutathione (GSH) levels. Our observations raise the question of whether metformin treatment could reduce oxidative stress and act as an ER stress modulator in T2D patients by promoting an adaptive unfolded protein response (*s-xbp1* and p-eIF2 α) in their leukocytes; this was in contrast with nonmetformin-treated patients whose response could be driven by the ATF6-dependent pro-apoptotic pathway. Further, our findings lead to us to form the hypothesis of an autophagy-dependent clearance of misfolded proteins in nonmetformin-treated T2D patients that could be repressed by metformin treatment.—*Antioxid. Redox Signal.* 28, 1562–1569.

Keywords: metformin, type 2 diabetes, ER stress, autophagy, oxidative stress, PBMCs

Introduction

TYPE 2 DIABETES (T2D) is one of the most serious health concerns worldwide. It is characterized by insulin resistance, and its main pathophysiological mechanisms are oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation. Available treatments for T2D include different types of oral antidiabetic drugs, with metformin constituting one of the most commonly used. The mechanism of action of this biguanide lowers hepatic gluconeogenesis, which leads to a decrease in the endogenous liver production of glucose and, hence, a reduction in plasma levels of glucose. Although the

molecular mechanisms of metformin are not yet fully elucidated, it has been described to inhibit mitochondrial complex I and to activate AMP-activated protein kinase, thus improving insulin sensitivity (6).

T2D has been widely associated with oxidative stress (4), endoplasmic reticulum (ER) stress (7), and autophagy (8), mechanisms that may contribute to its pathogenesis.

The ER is a crucial system for protein synthesis and sensing stress; in fact, it initiates the unfolded protein response (UPR) when unfolded or misfolded proteins accumulate in the cell. Three different signaling pathways can be triggered under ER stress conditions: protein kinase RNA-like ER kinase (PERK),

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

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

³Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain.

Departments of ⁴Medicine and ⁵Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain.

Innovation

Metformin treatment is believed to reduce oxidative stress; nevertheless, the impact of this drug on endoplasmic reticulum stress and autophagy in leukocytes under type 2 diabetes (T2D) conditions has not yet been studied. This work not only confirms the antioxidant effects of metformin but also suggests that it is a potential modulator of unfolded protein response (UPR) and autophagy that drives T2D leukocytes to activate the adaptive spliced X-box binding protein 1 (s-XBP1)- and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α (p-eIF2 α)-dependent UPR branches. On the contrary, in non-metformin patients, the apoptotic activating transcription factor 6 (ATF6)-dependent pathway seems to be activated together with an autophagy-dependent clearance of misfolded proteins.

inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), and activating transcription factor 6 (ATF6). Seventy-eight-kDa glucose-regulated protein (GRP78) is a chaperone protein that acts as an ER stress sensor and controls the activation of UPR signaling through the three UPR transducers (PERK, IRE1, and ATF6) (3). The UPR is triggered in three ways: (a) through phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) by PERK, which leads to attenuation of protein translation; (b) through the splicing of X-box-binding protein 1 (XBP1) messenger ribonucleic acid (mRNA) by IRE1; and (c) through translocation of active ATF6 to the nucleus, which promotes the expression of UPR-related genes and of the proapoptotic CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein, CHOP, under chronic stress conditions (5). Nevertheless, during severe ER stress conditions, diverse autophagy genes are induced by the UPR (2). Autophagy is the process by which unnecessary or damaged organelles and aggregated proteins are degraded. Regulation of autophagy involves proteins such as the microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), Beclin1 (BECN1), and autophagy-related 7 (ATG7). Although autophagy is an essential process for normal cell development and survival during starvation conditions, it can lead to pathological conditions when excessive.

In previous studies, our group has highlighted an induction of ER stress and autophagy in the leukocytes of T2D patients (7, 8). Further, we have demonstrated that metformin exerts beneficial effects by protecting T2D leukocytes from oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions (4). However, the effect of metformin treatment on ER stress and autophagy has not yet been explored.

In light of the aforementioned evidence, we wondered whether metformin treatment might modulate ER stress, autophagy, and oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of T2D patients. Therefore, we evaluated the expression levels of the principal ER and autophagy markers, as well as some oxidative stress parameters, in PBMCs of metformin- and nonmetformin-treated T2D subjects.

Results*Anthropometric and metabolic characteristics*

Our cohort was composed of 53 T2D patients (16 of whom were not treated with metformin and 37 of whom

received it as the main antidiabetic drug) and 30 healthy subjects whose anthropometrical and metabolic parameters are shown in Table 1. The three groups presented similar age and gender percentage. T2D patients presented higher weight ($p < 0.01$ in the group without metformin, and $p < 0.001$ in those with metformin), body mass index (BMI, $p < 0.001$), waist circumference ($p < 0.001$), and systolic blood pressure (SBP, $p < 0.05$) than control subjects. Glucose metabolism parameters were higher in T2D patients than in control subjects; that is, fasting glucose ($p < 0.001$), fasting insulin ($p < 0.01$ in metformin-treated patients), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR, $p < 0.05$ in patients without metformin and $p < 0.001$ in the metformin-treated group), and glycated hemoglobin (HbA1c, $p < 0.001$). Analysis of lipid profile revealed that T2D patients had lower levels of total cholesterol ($p < 0.001$), high-density lipoprotein (HDL) ($p < 0.001$), and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol ($p < 0.05$ in non-metformin group and $p < 0.001$ in metformin-treated group) than controls. Triglyceride levels were increased only in the group of metformin-treated patients ($p < 0.05$). High-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) was elevated in T2D patients without ($p < 0.01$) and with metformin ($p < 0.001$) with respect to controls. Parameters were BMI adjusted, as BMI is significantly higher in T2D. On doing this, differences between the groups in SBP, fasting insulin, triglycerides, and hs-CRP disappeared; whereas differences in the rest of the parameters with respect to controls remained as follows: glucose ($p < 0.001$), HOMA-IR ($p < 0.05$), HbA1c ($p < 0.001$), total cholesterol ($p < 0.001$), HDL cholesterol (HDL-c) ($p < 0.01$), and LDL cholesterol (LDL-c) ($p < 0.01$).

ER stress parameters

Protein expression of the ER stress indicators GRP78, phosphorylated-eIF2 α (p-eIF2 α) and ATF6, and mRNA expression of spliced X-box-binding protein 1 (*s-xbp1*) were measured to assess which of the ER stress pathways were activated in PBMCs. All diabetic patients displayed higher levels of GRP78 than controls ($p < 0.05$, Fig. 1A), whereas p-eIF2 α levels were higher only among patients taking metformin ($p < 0.01$ with respect to controls and $p < 0.05$ compared with non-metformin T2D, Fig. 1B), a trend that was accompanied by enhanced levels of *s-xbp1* mRNA ($p < 0.001$ compared with controls and $p < 0.05$ with respect to T2D without metformin, Fig. 1D). Nevertheless, ATF6 was specifically increased in non-metformin-treated patients ($p < 0.05$ compared with controls, Fig. 1C); in fact, ATF6 levels in metformin-treated T2D patients reverted to control values ($p < 0.05$ with respect to the T2D group).

Autophagy levels

Nonmetformin-treated T2D patients showed higher mRNA levels of *becn1* ($p < 0.01$, Fig. 2A) and *atg7* ($p < 0.05$, Fig. 2B) than controls. However, patients receiving metformin displayed *becn1* and *atg7* levels similar to those seen in controls ($p < 0.01$ with respect to non-metformin T2D). Similarly, LC3 II/I ratio was higher in non-metformin-treated patients ($p < 0.05$ compared with controls), whereas it reverted to control values in metformin-treated T2D patients ($p < 0.05$ compared with T2D).

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC, METABOLIC, AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION

	Control	T2D	T2D + metformin	p	BMI-adjusted p
N	30	16	37		
Male (%)	53.3	62.5	59.5	ns	
Age (years)	50.8±8.3	56.5±8.9	56.2±8.5	ns	
Weight (kg)	69.0±13.4	88.0±12.2**	87.6±17.7***	<0.001	
BMI (kg/m ²)	24.6±3.6	33.1±5.2***	31.2±4.5***	<0.001	
Waist circumference (cm)	82.9±13.9	109.0±8.7***	106.9±13.0***	<0.001	
SBP (mmHg)	127.2±24.6	143.9±10.0*	138.1±15.8*	<0.05	ns
DBP (mmHg)	78.8±14.2	86.3±4.8	79.3±7.5	ns	ns
Glucose (mg/dL)	90.1±11.6	122.1±28.4***	134.8±35.7***	<0.001	<0.001
Insulin (μUI/mL)	8.5±6.3	11.3±3.3	14.4±7.8**	<0.01	ns
HOMA-IR	1.9±1.5	3.9±2.2*	5.0±2.8***	<0.001	<0.05
HbA1c (%)	5.4±0.3	6.6±1.4***	6.8±1.1***	<0.001	<0.001
Total cholesterol (mg/dL)	204.8±27.9	170.0±30.3***	163.6±37.0***	<0.001	<0.001
HDL-c (mg/dL)	60.4±22.9	41.6±9.3***	42.5±8.1***	<0.001	<0.01
LDL-c (mg/dL)	125.6±22.4	105.5±28.2*	93.5±33.0***	<0.001	<0.01
Triglycerides (mg/dL)	98.5 (58.0–126.0)	119 (96.5–149.6)	124.0 (95.0–177.3)*	<0.05	ns
hs-CRP (mg/L)	0.57 (0.36–1.47)	3.53 (2.38–9.13)**	3.42 (1.56–7.99)***	<0.001	ns
Treatment (%)					
Statins	—	50.0	62.2	ns	
Fibrate	—	18.8	18.9	ns	
DPP-4 inhibitors	—	43.8	35.1	ns	
Sulfonylureas	—	0	2.7	ns	
Glitazones	—	0	8.1	ns	
Glinides	—	0	8.1	ns	
GLP-1 agonists	—	12.5	21.6	ns	

Parametric data are shown as mean±SD, and nonparametric data are indicated as median (25th–75th quartiles). Proportions among groups were compared by a Chi-Square test. Comparisons of parametric data were made by one-way ANOVA and Newman-Keuls multiple-comparison *post hoc* test. Nonparametric data were compared with a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple-comparison *post hoc* test. Influence of BMI as a confounding variable on the compared parameters was minimized by applying a univariate general linear model for analyzing biochemical parameters and serum lipids. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ when compared with controls.

ANOVA, analysis of variance; BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; DPP-4, dipeptidyl peptidase-4; GLP-1, glucagon-like peptide-1; 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; SD, standard deviation; T2D, type 2 diabetes.

Oxidative stress assessment

Non-metformin-treated T2D patients presented higher mitochondrial superoxide production than controls (Fig. 3A, $p < 0.05$) and a decrease in intracellular glutathione (GSH) content (Fig. 3B, $p < 0.01$). Interestingly, patients under metformin treatment showed a decrease in mitochondrial superoxide levels when compared with non-metformin-treated T2D ($p < 0.01$) to similar values to those expressed in controls (Fig. 3A). Further, an increase in intracellular GSH levels was observed in metformin-treated patients with respect to those non-treated with the drug (Fig. 3B, $p < 0.05$).

Discussion

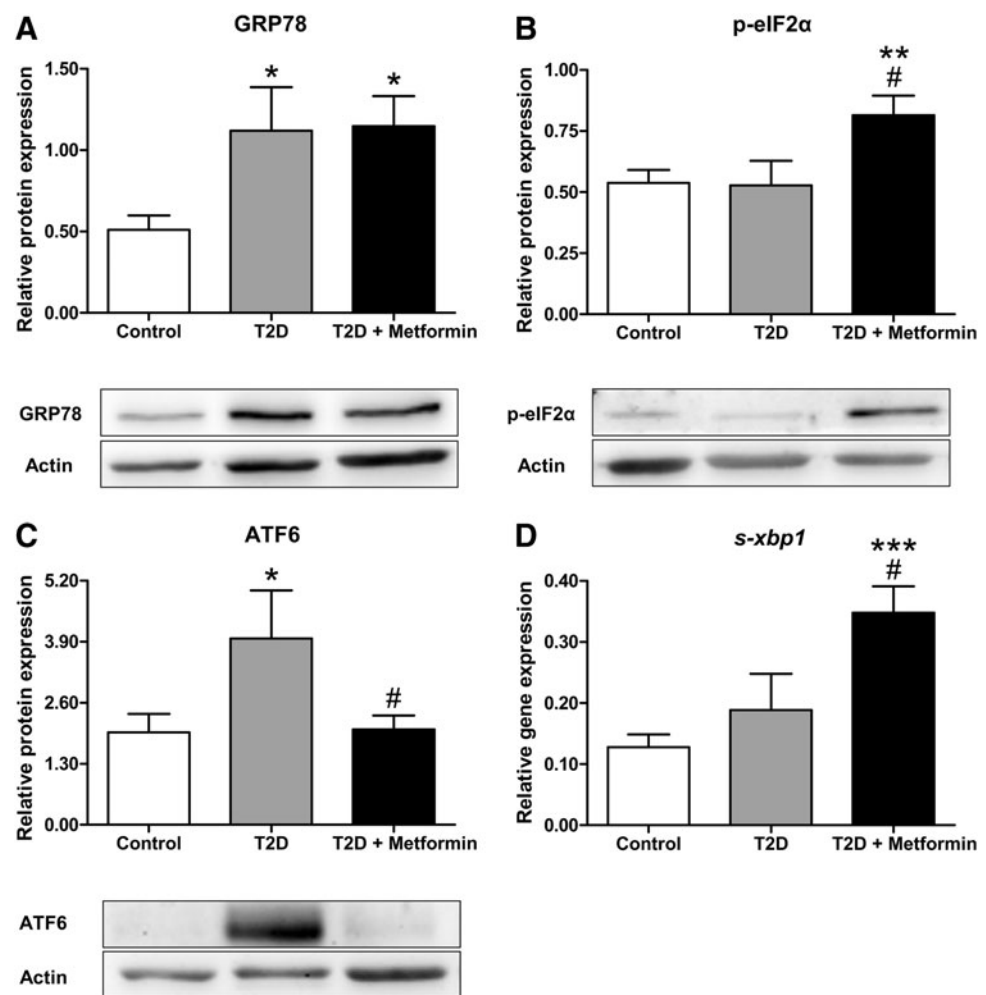
We have studied how metformin treatment can modulate ER stress, autophagy, and oxidative stress in PBMCs of T2D patients. We demonstrate that PBMCs of T2D patients have higher levels of GRP78 than control subjects independently of whether or not they are receiving metformin treatment, suggesting an increase in ER stress under diabetic conditions. However, after evaluating in depth the three ER stress pathways, we observed that PBMCs of nonmetformin-treated T2D patients presented increased protein levels of ATF6, whereas metformin-treated patients showed increases in *s-xbp1* mRNA levels and p-eIF2 α protein levels. In addition,

although PBMCs from non-metformin-treated T2D subjects displayed higher levels of *becn1*, *atg7*, and LC3II/I ratio than control subjects; expression levels of these autophagy-related genes were reverted to control values in metformin-treated T2D patients, thus suggesting a modulating effect of metformin on autophagy. Finally, the leukocytes of our nonmetformin-treated T2D patients displayed higher levels of mitochondrial superoxide and lower levels of antioxidant defenses (GSH content), and these levels were reverted in metformin-treated patients, thereby confirming the antioxidant effect of this drug.

The pathophysiology of T2D involves enhanced oxidative stress induced as a consequence of high plasma glucose, lipids, and cytokine levels, which can trigger ER stress. The UPR is then activated due to a loss in the ER's capacity to handle the excess of aberrant proteins. Previous research has shown increases in ER stress markers in leukocytes of T2D patients, especially in those with poor glycemic control, which, interestingly, also exhibited enhanced levels of reactive oxygen species (ROS) (7). Leukocytes from well-controlled T2D patients (HbA1c<7%) exhibited an adaptive response to ER stress in which the IRE1 UPR branch was activated; this was in contrast to poorly controlled patients (HbA1c>7%), in whom the response shifted to the ATF6 branch (7).

Metformin has become the first-line therapy for the initial treatment of T2D, and it is widely prescribed for treating

FIG. 1. ER stress markers in T2D patients (treated or not with metformin) and in healthy volunteers. Figure shows bar graphs comparing levels of relative protein expression of (A) GRP78, (B) p-eIF2 α , and (C) ATF-6 between healthy control subjects and T2D patients with and without metformin treatment by Western blotting analysis. Representative images of WB bands are shown below each respective graph. (D) *s-xbp1* relative mRNA expression levels. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared with control volunteers. # $p < 0.05$ with respect to T2D patients without metformin treatment. ATF6, activating transcription factor 6; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, 78-kDa glucose-regulated protein; mRNA, messenger ribonucleic acid; p-eIF2 α , phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α ; *s-xbp1*, spliced X-box-binding protein 1; T2D, type 2 diabetes.



diseases related with insulin resistance. This biguanide has demonstrated beneficial effects on oxidative stress by decreasing ROS production in the leukocytes of T2D patients (4). This work demonstrates that UPR is activated in T2D leukocytes independently of whether or not metformin is administered, as manifested by the enhancement of GRP78 protein levels. Further, PBMCs from non-metformin-treated T2D patients showed higher levels of ATF6, whereas this protein reverted to control levels in metformin-treated subjects, in whom an increase in the expression levels of *s-xbp1* and p-eIF2 α was detected. Thus, suggesting metformin as an ER stress modulator that drives PBMCs to the adaptive IRE1 and PERK pathways of UPR and protects them from the proapoptotic branch triggered by ATF6. In addition, metformin-treated T2D patients expressed lower levels of oxidative stress (decreased mitochondrial superoxide levels and increased intracellular GSH content) than those non-metformin-treated patients, thus confirming our previously reported results obtained in a different cohort of patients (4). Taken together, these findings pose the question of whether metformin promotes ER stress modulation *via* the regulation of oxidative stress.

Autophagy has been widely related to ER function; in fact, it plays an important role in maintaining the functional and structural integrity of mitochondria and ER. Further, ER stress triggers autophagy to promote the clearance of

misfolded proteins and counterbalance ER expansion (2). In T2D, autophagy acts as a protective mechanism toward stress responses in pancreatic β -cells under insulin resistance. Nevertheless, under certain conditions, autophagic vesicles accumulate and lead to type 2 programmed cell death. Consequently, autophagy can play a protective or harmful role in each specific situation and cell type, thus highlighting its context-dependent role in the pathophysiology of T2D.

We have previously reported that leukocytes from T2D patients display activation of autophagy, expressed by higher BECN1 and LC3-II levels than those seen in healthy volunteers (8). In this study, we have observed that nonmetformin-treated patients displayed higher levels of *becn1*, *atg7*, and a higher LC3II/I ratio than controls. These parameters reverted to control values in subjects treated with metformin, suggesting a possible role of metformin in the modulation of autophagy. We hypothesize that nonmetformin-treated T2D subjects experience an enhancement of oxidative stress and of the ATF6-dependent pro-apoptotic pathway, which eventually activates autophagic responses for the cell to eliminate misfolded proteins. In contrast, patients treated with metformin, in whom oxidative stress seems to be counteracted and the adaptive UPR is prompted *via* enhanced levels of *s-xbp1* and p-eIF2 α , seem to be able to handle ER stress without activating autophagic mechanisms. This hypothesis is supported by research showing that

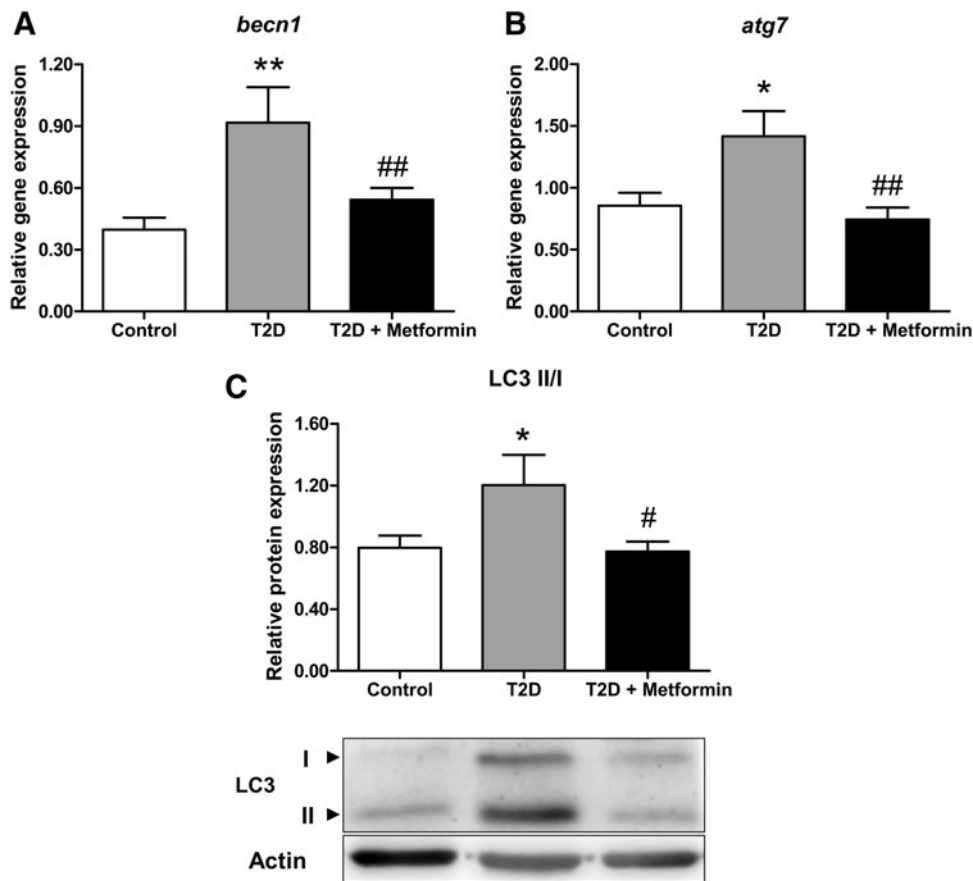


FIG. 2. Assessment of autophagy markers in control subjects and in T2D patients with or without metformin treatment. (A) *becn1* and (B) *atg7* mRNA expression levels in the three groups of patients. (C) Graph showing LC3 II/I protein expression ratio and representative Western blot image of LC3 I, LC3 II, and actin. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; when compared with control volunteers. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ with respect to non-metformin-treated T2D patients. *atg7*, autophagy related protein 7; *becn1*, beclin1; LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3.

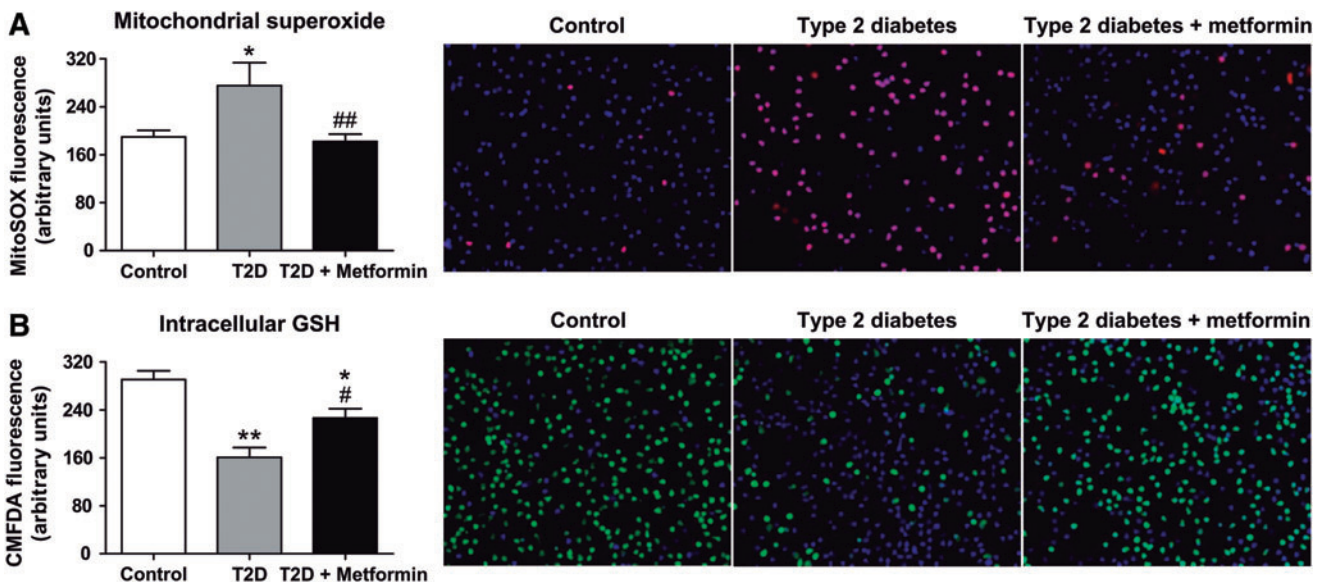


FIG. 3. Oxidative stress parameters in leukocytes of T2D patients with or without metformin treatment and of control subjects. (A) Levels of mitochondrial superoxide measured as MitoSOX red fluorescence and expressed as arbitrary units. Representative images of leukocytes stained with MitoSOX (red) and Hoechst 33342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy. (B) Intracellular GSH content assessed by CMFDA green fluorescence and expressed as arbitrary units. Representative images of leukocytes stained with CMFDA (green) and Hoechst 33342 (blue) and visualized by fluorescence microscopy. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; with respect to control volunteers. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ when compared with nonmetformin-treated T2D patients. CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; GSH, glutathione. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

metformin inhibits autophagy in microvascular endothelial cells under conditions of glucose starvation (9), and by the reported effects of metformin treatment on prostate cancer cells, in which 2-deoxyglucose-induced expression of Beclin-1 and LC3 is repressed by addition of metformin (1).

To sum up, our data suggest that T2D promotes ER stress, manifested by enhanced GRP78 levels. PBMCs can respond to this increase if metformin treatment is administered. Thus, nonmetformin-treated patients show an increase of the ATF6-dependent pro-apoptotic pathway of UPR, as well as a rise in the autophagy mediators *becn1*, *atg7*, and LC3 II/I, suggesting a possible autophagy-dependent clearance of unfolded proteins. In contrast, in metformin-treated patients, the adaptive branches of UPR (*s-xbp1* and p-eIF2 α) are potentiated and levels of *becn1*, *atg7*, and LC3 II/I revert to values similar to those seen in controls, which suggests that metformin is a modulator of UPR response and autophagy in PBMCs under T2D conditions. Future mechanistic studies may reveal direct targets of metformin that mediate autophagy and ER responses.

Notes

Subjects

This work is an observational, cross-sectional descriptive study in which 53 T2D patients from our Endocrinology and Nutrition Service (University Hospital Dr. Peset, Valencia, Spain) and 30 healthy controls were included. T2D patients were divided into two groups depending on whether they were being treated or not with metformin, resulting in a group of 16 patients without metformin treatment and 37 with metformin treatment (850 mg orally twice a day for at least 1 year). T2D patients in both groups were selected in a way that they shared similar metabolic and anthropometrical characteristics. Healthy controls of a similar age to the T2D patients were voluntarily recruited. T2D was diagnosed according to the American Diabetes Association's criteria. Diagnosis was confirmed when one or more of the following criteria were fulfilled: (1) levels of fasting serum glucose ≥ 126 mg/dL; (2) random serum glucose ≥ 200 mg/dL on at least two occasions; (3) HbA1c $\geq 6.5\%$; and (4) antidiabetic medication. The exclusion criteria were documented history of cardiovascular disease (stroke, ischemic heart disease, peripheral vascular disease, etc.), autoimmune, infectious, inflammatory, hematological, or malignant disease. Patients receiving treatment with insulin were also excluded from the study.

The study was performed according to the ethical criteria of the Helsinki Declaration and with the approval of the Ethics Committee of the Hospital Dr. Peset. Informed consent was obtained from every single participant.

Clinical and biochemical determinations

Before collecting blood samples, patients underwent a physical examination to obtain anthropometrical information such as weight (kg), height (m), BMI (kg/m²), waist circumference (cm), and systolic and diastolic blood pressure (mmHg). Blood samples were obtained from the antecubital vein and collected in appropriate analysis tubes for biochemical and molecular determinations. 1500 g centrifugation was performed for 10 min at 4°C to obtain the serum.

Levels of total cholesterol, triglycerides, and glucose in serum were determined by enzymatic assay. HDL-c levels were quantified with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., CA), and LDL-c concentration was calculated by Friedewald's formula. Percentage of HbA1c was obtained with an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkray, Inc., Kyoto, Japan). Fasting insulin levels were measured by immunochemiluminescence (Abbott, IL), and HOMA-IR was calculated to evaluate insulin resistance (fasting insulin [μ U/mL] \times fasting glucose [mg/dL]/405). High-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) was measured by a latex-enhanced immunonephelometric assay.

Cell isolation

PBMCs were isolated from heparinized blood samples. Extractions were performed by incubating whole blood samples with half a volume of dextran (3% w/v in saline solution; Sigma-Aldrich, MO, US) for 45 min at room temperature. Supernatants were collected, placed over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and centrifuged at 650 g for 25 min at room temperature to obtain a stratified sample. Middle phases containing PBMCs were collected and centrifuged at 650 g for 10 min at room temperature. After washing with phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich) and counting, an aliquot of the sample was freshly employed for static cytometry studies, and two identical pellets of each sample (one for real-time polymerase chain reaction [RT-qPCR] and the other for WB assay) were stored at -80°C until use.

Real-time polymerase chain reaction

The expression of genes involved in autophagy and ER stress was assessed by RT-qPCR analysis. Total RNA extraction from PBMCs was performed by using the GeneAll[®] Ribospin[™] kit (Geneall Biotechnology, Hilden, Germany). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay was performed with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) by using 1 μ g

TABLE 2. qPCR PROTOCOL AND SEQUENCE OF THE PRIMERS

qPCR protocol				
Temperature	95°C	95°C	60°C	Melting curve
Time	10 min	10 s	30 s	
No. of cycles	1	40		
Primers				
Target	Direction	Sequence (5'—3')		
<i>s-xbp1</i>	Forward	CTGAGTCCGCAGCAGGTG		
	Reverse	AACAGGATATCAGACTCTGAA TCTGAA		
<i>becn1</i>	Forward	CCCCAGAACAGTATAACGGCA		
	Reverse	AGACTGTGTTGCTGCTCCAT		
<i>atg7</i>	Forward	CAGCAGTGACGATCGGATGA		
	Reverse	GGCTGACGGGAAGGACATTA		
<i>GAPDH</i>	Forward	CGCATCTTCTTTTTCGCTCG		
	Reverse	TTGAGGTCAATGAAGGGGTCA		

atg7, autophagy-related 7; *becn1*, beclin1; *s-xbp1*, spliced X-box binding protein 1.

of the extracted RNA. Finally, RT-qPCR was performed by using KAPA SYBR FAST universal master mix (KAPA Biosystems, MA) in a 7500 Fast RT-PCR system (Thermo Fisher Scientific). A summary of the protocol steps and primer sequences is provided in Table 2. Expression Suite software (Thermo Fisher Scientific) was employed to apply the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and, hence, the relative quantification analysis of the samples, by using *GAPDH* as a housekeeping internal control.

Western blot

PBMC pellets obtained from the subjects of the study were lysed for 15 min at 4°C with cell lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 0.1 mM EDTA, 10 μ M Na_2MoO_4 , 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol) and protease inhibitor mixture (10 mM NaF, 1 mM NaVO_3 , 10 mM PNP, 10 mM β -glycerolphosphate) and then centrifuged for 15 min to discard cellular membranes. A BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific) was used for determining the protein concentration of the samples. Mixes containing 25 μ g of protein and loading buffer solution were resolved on 13% acrylamide (Sigma-Aldrich) gels by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes (BIO-RAD, CA), which were blocked at room temperature for 1 h and incubated with primary antibodies at 4°C overnight.

The following primary antibodies were used: Actin (Sigma-Aldrich), BECN1 (Abcam, Cambridge, UK), LC3 (Merk Millipore, MA, US), GRP78 (Abcam), p-eIF2 α (Invitrogen), and ATF6 (Thermo Fisher Scientific). Blots were incubated with the correspondent secondary antibody: horseradish peroxidase (HRP) goat anti-rabbit (Merk Millipore) or HRP goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific). Developing was performed with Supersignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) or ECL plus reagent (GE Healthcare, IL). A Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) was used to visualize the bands, and signals were analyzed and quantified by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat). All protein values were normalized to actin.

Static cytometry assay

Isolated leukocytes were seeded in 48-well plates (150,000 cells/well) and incubated for 30 min at 37°C with 5 μ M MitoSOX™ Red reagent, or 1 μ M CellTracker™ Green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) fluorescent probes (Thermo Fisher Scientific). Hoechst 33342 nucleic acid stain (4 μ M, Sigma-Aldrich) was used to visualize nuclei. A fluorescence microscope (IX81; Olympus, Hamburg, Germany) coupled with the static cytometry software “ScanR” was employed to measure mitochondrial production of superoxide and intracellular GSH content.

Data analysis

The statistical analysis of data was performed by using SPSS 17.0 Software (SPSS Statistics, Inc.). Normally distributed variables were expressed as mean \pm standard deviation and compared with one-way analysis of variance and Newman–Keuls multiple-comparison *post hoc* test, whereas non-normally distributed variables were expressed as median

and 25th–75th quartiles and compared by means of the Kruskal–Wallis and Dunn’s multiple-comparison *post hoc* tests. To compare proportions among groups, a Chi-Square test was performed. Possible confounding variables, such as BMI, were used as covariates to generate a univariate general linear model for analyzing biochemical parameters and serum lipids. For all the tests, a confidence interval of 95% was used and differences were considered significant when $p < 0.05$.

Acknowledgments

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia-CIBERehd) for his editorial assistance, Rosa Falcon & Carmen Ramirez (FISABIO) for their technical assistance, and Juan Esplugues Foundation for its economical support. This study was financed by grants PI15/1424, PI16/1083, PI16/0301, and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute and by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”); UGP15-193 and UGP15-220 by FISABIO; and GV/2016/169 and PROMETEOII2014/035 by the Department of Education of the Valencian Regional Government. N.D.-M. is recipient of a PFIS contract from Carlos III Health Institute (FI14/00125). F.I. has a contract from Generalitat Valenciana (GRISOLIAP/2016/015). I.E.-L. is recipient of a predoctoral contract from FISABIO (UGP-15-144). C.B. has a Sara Borrell postdoctoral contract from Carlos III Health Institute (CD14/00043). S.R.-L. is recipient of a Juan de la Cierva-Formación contract from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FJCI-2015-25040). V.M.V. and M.R. are recipients of contracts from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government and Carlos III Health Institute (CES10/030 and CPII16/00037, respectively).

References

1. Ben Sahra I, Tanti JF, and Bost F. The combination of metformin and 2 deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy* 6: 670–671, 2010.
2. Bernales S, McDonald KL, and Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 4: e423, 2006.
3. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, and Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326–332, 2000.
4. Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Banuls C, Lopez-Domenech S, Escribano-Lopez I, Veses S, Jover A, Rocha M, Hernandez-Mijares A, and Victor VM. Does metformin protect diabetic patients from oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions? *Antioxid Redox Signal* 10: 1439–1445, 2017.
5. Kim I, Xu W, and Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7: 1013–1030, 2008.
6. Pernicova I and Korbonits M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 10: 143–156, 2014.
7. Rovira-Llopis S, Banuls C, Apostolova N, Morillas C, Hernandez-Mijares A, Rocha M, and Victor VM. Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal* 21: 1759–1765, 2014.

8. Rovira-Llopis S, Diaz-Morales N, Banuls C, Blas-Garcia A, Polo M, Lopez-Domenech S, Jover A, Rocha M, Hernandez-Mijares A, and Victor VM. Is autophagy altered in the leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal* 23: 1050–1056, 2015.
9. Samuel SM, Ghosh S, Majeed Y, Arunachalam G, Emar MM, Ding H, and Triggle CR. Metformin represses glucose starvation induced autophagic response in microvascular endothelial cells and promotes cell death. *Biochem Pharmacol* 132: 118–132, 2017.

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

Dr. Antonio Hernandez-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, October 16, 2017;
date of acceptance, October 22, 2017.

Abbreviations Used

ATF6 = activating transcription factor 6
 ATG7 = autophagy-related 7
 BECN1 = beclin1
 BMI = body mass index
 CMFDA = 5-chloromethylfluorescein diacetate
 eIF2 α = eukaryotic initiation factor 2 α
 ER = endoplasmic reticulum
 GRP78 = 78-kDa glucose-regulated protein
 GSH = glutathione
 HbA1c = glycated hemoglobin
 HDL = high-density lipoprotein
 HDL-c = high-density lipoprotein cholesterol
 HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance
 HRP = horseradish peroxidase
 hs-CRP = high-sensitive C-reactive protein
 IRE1 = inositol-requiring enzyme 1
 LC3 = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
 LDL = low-density lipoprotein
 LDL-c = low-density lipoprotein cholesterol
 mRNA = messenger ribonucleic acid
 PBMC = peripheral blood mononuclear cell
 p-eIF2 α = phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α
 PERK = protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
 ROS = reactive oxygen species
 RT-qPCR = real-time polymerase chain reaction
 SBP = systolic blood pressure
 s-xbp1 = spliced X-box-binding protein 1
 T2D = type 2 diabetes
 UPR = unfolded protein response
 XBP1 = X-box-binding protein 1

ANEXO II

Otras publicaciones con autoría durante el desarrollo de la tesis doctoral

1. Iannantuoni, F., **Diaz-Morales, N. (Co-First Author)**, Escribano-Lopez, I., Sola, E., Roldan-Torres, I., Apostolova, N., Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Rocha, M., and Victor, V.M. (2018). Does Glycemic Control Modulate the Impairment of NLRP3 Inflammasome Activation in Type 2 Diabetes? *Antioxid. Redox Signal.*

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,530

Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1^{er} decil)

2. Escribano-Lopez, I., Bañuls, C., **Diaz-Morales, N.**, Iannantuoni, F., Rovira-Llopis, S., Gomis, R., Rocha, M., Hernandez-Mijares, A., Murphy, M.P., Victor, V.M. (2018). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates mitochondrial function and endoplasmic reticulum stress in pancreatic β cells exposed to hyperglycaemia. *Cell. Physiol. Biochem. Accepted.*

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,500

Categoría: PHYSIOLOGY (1^{er} decil)

3. Lopez-Domenech, S., Martinez-Herrera, M., Abad-Jimenez, Z., Morillas, C., Escribano-Lopez, I., **Diaz-Morales, N.**, Bañuls, C., Victor, V.M., Rocha, M. (2018). Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes of obese humans. *Int. J. Obes. (Lond). Accepted.*

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,151

Categoría: NUTRITION & DIETETICS (1^{er} cuartil)

4. Escribano-Lopez, I., **Diaz-Morales, N.**, Iannantuoni, F., Lopez-Domenech, S., de Maranon, A.M., Abad-Jimenez, Z., Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Herance, J.R., Rocha, M., and Victor, V.M. (2018). The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 8, 15862-018-34251-8.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 4,122

Categoría: MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1^{er} cuartil)

5. Rovira-Llopis, S., Escribano-Lopez, I., **Diaz-Morales, N.**, Iannantuoni, F., Lopez-Domenech, S., Andujar, I., Jover, A., Pantoja, J., Pallardo, L.M., Bañuls, C., and Victor, V.M. (2018). Downregulation of miR-31 in Diabetic Nephropathy and its Relationship with Inflammation. *Cell. Physiol. Biochem.* 50, 1005-1014.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,500

Categoría: PHYSIOLOGY (1^{er} decil)

6. Lopez-Domenech, S., Bañuls, C., **Diaz-Morales, N.**, Escribano-Lopez, I., Morillas, C., Veses, S., Orden, S., Alvarez, A., Victor, V.M., Hernandez-Mijares, A., and Rocha, M. (2018). Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12985.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 3,086

Categoría: MEDICINE, GENERAL & INTERNAL (1^{er} cuartil)

7. Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Lopez-Domenech, S., **Diaz-Morales, N.**, Blas-Garcia, A., Veses, S., Morillas, C., Victor, V.M., Rocha, M., and Hernandez-Mijares, A. (2017). Oxidative and endoplasmic reticulum stress is impaired in leukocytes from metabolically unhealthy vs healthy obese individuals. *Int. J. Obes. (Lond)* 41, 1556-1563.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,151

Categoría: NUTRITION & DIETETICS (1^{er} cuartil)

8. Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., de Maranon, A.M., **Diaz-Morales, N.**, Jover, A., Garzon, S., Rocha, M., Victor, V.M., and Hernandez-Mijares, A. (2017). Low testosterone levels are related to oxidative stress, mitochondrial dysfunction and altered subclinical atherosclerotic markers in type 2 diabetic male patients. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 155-162.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,020

Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1^{er} cuartil)

-
9. Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., **Diaz-Morales, N.**, Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., and Victor, V.M. (2017). Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* *11*, 637-645.

Tipo de publicación: Revisión bibliográfica

Factor de impacto: 7,126

Categoría: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (1^{er} cuartil)

10. Escribano-Lopez, I., **Diaz-Morales, N. (Co-First Author)**, Rovira-Llopis, S., de Maranon, A.M., Orden, S., Alvarez, A., Bañuls, C., Rocha, M., Murphy, M.P., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. (2016). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biol.* *10*, 200-205.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 7,126

Categoría: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (1^{er} cuartil)

11. Victor, V.M., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., **Diaz-Morales, N.**, Martinez de Maranon, A., Rios-Navarro, C., Alvarez, A., Gomez, M., Rocha, M., and Hernandez-Mijares, A. (2016). Insulin Resistance in PCOS Patients Enhances Oxidative Stress and Leukocyte Adhesion: Role of Myeloperoxidase. *PLoS One* *11*, e0151960

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 2,766

Categoría: MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1^{er} cuartil)

12. **Diaz-Morales, N.**, Rovira-Llopis, S., Escribano-Lopez, I., Bañuls, C., Lopez-Domenech, S., Falcon, R., de Maranon, A.M., Sola, E., Jover, A., Roldan, I., *et al.* (2016). Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle in Type 2 Diabetic Patients. *Curr. Pharm. Des.* *22*, 2650-2656.

Tipo de publicación: Revisión bibliográfica

Factor de impacto: 2,757

Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY (2^o cuartil)

13. Hernandez-Mijares, A., Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., **Diaz-Morales, N.**, Escribano-Lopez, I., de Pablo, C., Alvarez, A., Veses, S., Rocha, M., and Victor, V.M. (2016). Effects of simvastatin, ezetimibe and simvastatin/ezetimibe on mitochondrial function and leukocyte/endothelial cell interactions in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 247, 40-47.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 4,467

Categoría: PERIPHERAL VASCULAR DISEASE (1^{er} cuartil)

14. Rocha, M., **Diaz-Morales, N.**, Rovira-Llopis, S., Escribano-Lopez, I., Bañuls, C., Hernandez-Mijares, A., Diamanti-Kandarakis, E., and Victor, V.M. (2016). Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes. *Curr. Pharm. Des.* 22, 2640-2649.

Tipo de publicación: Revisión bibliográfica

Factor de impacto: 2,757

Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY (2^o cuartil)

15. Escribano-Lopez, I., **Diaz-Morales, N.**, Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Lopez-Domenech, S., Castello, R., Falcon, R., Sola, E., Rocha, M., Hernández-Mijares, A., and Victor, V.M. (2016). Atherosclerosis, mitochondrial dysfunction and oxidative stress: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. In *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Bentham Science Publishers) pp. 96-135.

Tipo de publicación: Capítulo de libro

16. Victor, V.M., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., **Diaz-Morales, N.**, Castello, R., Falcon, R., Gomez, M., Rocha, M., and Hernandez-Mijares, A. (2015). Effects of metformin on mitochondrial function of leukocytes from polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *Eur. J. Endocrinol.* 173, 683-691.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 4,333

Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1^{er} cuartil)

-
17. Rovira-Llopis, S., **Diaz-Morales, N.**, Bañuls, C., Blas-Garcia, A., Polo, M., Lopez-Domenech, S., Jover, A., Rocha, M., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. (2015). Is Autophagy Altered in the Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid. Redox Signal.* 23, 1050-1056.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,530

Categoría: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1^{er} decil)

18. Victor, V.M., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., **Diaz-Morales, N.**, Lopez-Domenech, S., Escribano-Lopez, I., Rios-Navarro, C., Alvarez, A., Gomez, M., Rocha, M., and Hernandez-Mijares, A. (2015). Metformin modulates human leukocyte/endothelial cell interactions and proinflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome patients. *Atherosclerosis* 242, 167-173.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 4,467

Categoría: PERIPHERAL VASCULAR DISEASE (1^{er} cuartil)

19. Rocha, M., Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Morillas, C., Veses, S., López-Doménech, S., **Diaz-Morales, N.**, Víctor, V.M., and Hernández-Mijares, A. (2015). Influence of factors that modulate efficacy of phytosterols. In *Phytosterols: Food sources, Functions and Health Benefits*, Nova Science Publishers

Tipo de publicación: Capítulo de libro