



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

[] **Facultat de Química**

**Estudio del efecto de los antioxidantes con diana
en la mitocondria, MitoQ y SS-31, sobre los
mecanismos moleculares asociados a la
fisiopatología de la diabetes tipo 2**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Química (3154)

Presentada por:

Irene Escribano López

Dirigida por:

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Dra. Milagros Rocha Barajas

Dra. Celia Bañuls Morant

Valencia, Mayo 2019

Programa de Doctorado 3154 en Química (RD 99/2011)
Facultad de Química
Universidad de Valencia

Doctoranda

Irene Escribano López
Graduada en Química
Universidad de Valencia

Directores

Dr. Víctor Manuel Víctor González
Investigador en FISABIO - Universidad de Valencia
Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dra. Milagros Rocha Barajas
Investigadora en FISABIO
Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dra. Celia Bañuls Morant
Investigadora en FISABIO
Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

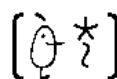
Con la colaboración de:

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.
Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).

Publicado en **Valencia 2019**



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



Facultat de Química

Dr. Víctor Manuel Víctor González, Investigador en la Fundación para el Fomento de 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. Milagros Rocha Barajas, Investigadora en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia,

Dra. Celia Bañuls Morant, Investigadora en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia,

CERTIFICAN

Que **Dña. Irene Escribano López**, Graduada en Química por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *“Estudio del efecto de los antioxidantes con diana en la mitocondria, MitoQ y SS-31, sobre los mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología de la diabetes tipo 2”* y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para la obtención del grado de Doctor en Química por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 20 de Mayo de 2019.

Dr. Víctor M Víctor González

Dra. Milagros Rocha Barajas

Dra. Celia Bañuls Morant

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset, perteneciente a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO). La financiación fue proporcionada por el Instituto de Salud Carlos III de Madrid a través de los proyectos PI16/1083 y PI16/00301 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), de la convocatoria de ayudas de la Acción Estratégica en Salud (AES). Esta Tesis Doctoral también ha sido realizada con la financiación del proyecto UGP-15-193 de FISABIO. Ayudas cofinanciadas con fondos FEDER “Una manera de hacer Europa”.

Irene Escribano López ha disfrutado de una Ayuda Predoctoral de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) con código de expediente UGP-15-144.

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

AGRADECIMIENTOS

Como en cada uno de mis pasos,

Primero y antes que nada,

Ojalá ~~tú~~ vosotros aquí.

Llegado este momento, es inevitable pararme a mirar atrás y pensar cómo he llegado hasta aquí. Esta tesis nació como una casualidad llena de intención y no existen palabras en este mundo para expresar lo agradecida que estoy.

Tengo la necesidad de dar las gracias en primer lugar al Dr. Víctor M Víctor quién predicando que “la fama cuesta” me enseñó que “al final siempre sale el sol”. Gracias por creer en mí, hacer posible que esta tesis comenzara, y dirigirla con optimismo hasta el final.

A la Dra. Milagros Rocha, por dirigir esta tesis con su capacidad única de guiar ideas propias con toda rigurosidad y por estar siempre dispuesta a aportar.

A la Dra. Celia Bañuls, verdadero ejemplo de empeño y dedicación, gracias por enseñarme tanto todo el tiempo. No lo sabes, pero, en parte, gracias a tus palabras yo estoy aquí. Agradecerte a ti siempre será sinónimo de quedarme corta.

A la Dra. Susana Rovira, un espejo en el que mirarse, gracias por coger mi mano durante los primeros pasos en esta aventura y no soltarla nunca. Con tu apoyo incondicional, me has facilitado los caminos a seguir, sin dudar de mi capacidad y sin pedir nada a cambio.

A la Dra. Pílar Campíns, por el tiempo dedicado no sólo a brindarme ayuda sino también a aconsejarme de la forma más sincera y acertada.

A cada uno de los profesionales del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Dr. Peset, pero especialmente al Dr. Antonio Hernández, a quién debo agradecer que fruto de la casualidad ofertara las prácticas externas que se convertirían en la puerta que tenía que atravesar hacia, la que sin duda ha sido, una de las grandes oportunidades de mi vida. También con especial cariño a Leo, todavía recuerdo tu llamada para darme la bienvenida. Tu profesionalidad superaba cualquier límite y siempre me mostraste cómo cuando la vida te da limones se hace limonada.

En el laborioso recorrido de este proyecto ha sido fundamental el apoyo de un increíble grupo de personas unidas por el amor a la ciencia al que me quedaría sin páginas para agradecer todo lo que han hecho por mí. Noelia, me has enseñado cómo se trabaja rozando la perfección; Sandra, como un libro abierto siempre he tenido en ti una sabia explicación; Francesca, inagotable fuente de energía, siempre dispuesta para todo; Rubén, has llegado como el soplo de aire fresco necesario; Aranzazu, siempre de la mano, pero sin tocar, sabiendo que puedo contar contigo en cualquier momento; Zaída María, ser de luz, contigo se me fueron las nubes negras, no sé qué hubiera hecho sin ti. A Óscar, Silvia, Vicente y Ana, sois muy especiales, como senderos de tranquilidad con quienes todo resulta más fácil.

Lo he tenido todo y más, porque un hogar lo hacen los brazos que aprietan fuerte y ahí estaban ellas, Rosa y Carmen. Brillais con luz propia y a vuestro lado no existen los túneles. Ni en mis mejores sueños hubiese imaginado que la suerte pusiera en mi camino un ángel así y no puedo creer el tesoro que supone contar con dos. Ni dando la vuelta al mundo encontraría siquiera a una persona que pudiera hacer sombra a una de vosotras.

Mientras escribo estas palabras, no puedo evitar recordar a maestros y profesores que me vieron crecer. Ana, Isabel, Fidel, Constanza, Almudena, Esperanza y muy especialmente, Jesús, quién me transmitió su pasión por la química.

Me dejo casi para el final a los pilares de mi vida y promotores de mis sueños. A mi madre, por el amor verdadero, soy porque tú eres. A mi hermana, mi soplo de aire, por ser cuando yo soy. A mi abuela, Josefa, porque tus brazos son el lugar más bonito del mundo. Abuela gracias por la lección de vida que nos das a diario demostrando que el amor, más que un te quiero, es un te cuido. A mi abuelo, Martín, por preocuparse de que nunca me faltara nada y hacerme fuerte diciéndome “no llores Irene, que estoy aquí”, porque, aunque te tenía aburrido a besos y sonriendo me preguntaras: “¿otro?” me han quedado muchos más, te cielo. A Rafa, por caminar a mi lado junto a Blanca y Tina, esperando que en los sitios donde echamos raíces nos sigan creciendo alas.

A Jose por quererme tanto y sobre todo tan bien, y a Rafael por ser ejemplo de que con esfuerzo todo se puede conseguir y por inspirarme si cabe más en la realización de este estudio.

A mis tíos y primos, que celebran con admiración cada meta alcanzada. En especial a, mi siempre pequeño, Jose Martín, pues un día su nacimiento fue la luz para seguir.

A Luis, por enseñarme a luchar por lo que uno quiere y, a cuidarlo y amarlo cuando se tiene como si no quisieras perderlo nunca.

A mis amigas de siempre, Selene, Inma y María José por estar ahí y quererme aún cuando me pongo la capa de invisibilidad, y es que la distancia siempre dice la verdad. Y como si fuesen de siempre, a M^a Elena y Clemente, antes de conoceros ya os echaba de menos porque sois imprescindibles. A Marta, a quién le bastaron unos días para ganarse mi corazón. Compartir mi vida universitaria contigo ha sido el mejor regalo que Valencia me ha dado. A Andrea, cuando pensaba que había agotado la fortuna de conocer grandes personas, vas y llegas tú, a ponerle la guinda a mi pastel y hacerme tanto bien. A mis compañeros de carrera, Carlos, Marta, Esther, Ximo, Jose, Arturo, Mariado, Jose Sahuquillo, Dani y Pedro por todos los momentos que vivimos juntos que no han sido pocos.

Gracias a todos por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía.

*“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque
he subido a hombros de gigantes”*

Isaac Newton

A mi madre y mi hermana
A Martín y Josefa, mis abuelos
A Rafa

ÍNDICE

INDICE DE CONTENIDOS

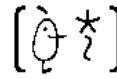
NORMATIVA Y ESTRUCTURA	23
ABREVIATURAS	27
SUMARIO	33
RESUMEN GLOBAL	43
1. TEMÁTICA.....	45
1.1. Diabetes mellitus tipo 2 (T2D)	47
1.1.1. Definición.....	47
1.1.2. Criterios diagnósticos	47
1.1.3 Epidemiología	47
1.1.4. Fisiopatología.....	48
1.1.4.1. Papel de las células β en la homeostasis de la glucosa	48
1.1.4.2. Resistencia a la insulina	51
1.1.4.3. Función/Disfunción β pancreática.....	52
1.1.5. Comorbilidades asociadas a la T2D: manifestaciones clínicas	53
1.1.5.1. Sobrepeso y obesidad.....	53
1.1.5.2. Hipertensión arterial	55
1.1.5.3. Dislipemia aterogénica	56
1.2. Mecanismos moleculares asociados a la T2D.....	58
1.2.1. Estrés oxidativo.....	58
1.2.1.1. Definición.....	58
1.2.1.2. Generación de ROS.....	58
1.2.1.3. Mitocondria como fuente de ROS.....	59
1.2.1.4. Defensas antioxidantes	60
1.2.1.5. Papel del estrés oxidativo en la T2D.....	62
1.2.1.6. Disfunción mitocondrial	65
1.2.2. Estrés de retículo endoplasmático	67
1.2.2.1. Retículo endoplasmático (ER).....	67
1.2.2.2. Respuesta al mal plegamiento proteico	67
1.2.2.3. Papel de estrés de ER en la T2D	70
1.2.2.4. Relación entre estrés oxidativo, estrés de ER e inflamación.....	72

1.3. Procesos subyacentes asociados al riesgo cardiovascular en la T2D	73
1.3.1. Inflamación	73
1.3.2. Disfunción endotelial.....	75
1.3.3. Interacción leucocito-endotelio.....	76
1.3.4. Desarrollo de aterosclerosis	77
1.3.5. Consecuencias vasculares de la T2D.....	79
1.3.5.1. Complicaciones microvasculares.....	81
1.3.5.2. Complicaciones macrovasculares.....	81
1.4. Antioxidantes en la T2D.....	82
1.4.1. La mitocondria como diana terapéutica.....	83
1.4.2. Antioxidantes mitocondriales.....	87
1.4.2.1. Mitoquinona	87
1.4.2.2. Tetrapéptido SS-31	91
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	97
3. PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
4. CONCLUSIONES	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
ANEXO I. PUBLICACIONES	159
ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ADICIONAL	195

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Insulina, glucagón y homeostasis de la glucosa	49
Figura 2. Islote de Langerhans	50
Figura 3. Mecanismos asociados a la resistencia a la insulina	52
Figura 4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena de transporte electrónico (ETC) ...	61
Figura 5. Rutas de estrés oxidativo inducido por hiperglucemia	65
Figura 6. Respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR).....	69
Figura 7. Proceso de adhesión de los leucocitos y formación de la placa aterosclerótica	78

NORMATIVA Y ESTRUCTURA

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultat de Química

La presente tesis doctoral se ha estructurado como compendio de publicaciones y, por tanto, cumpliendo la normativa aprobada por la Escuela de Doctorado y la Comisión Académica del Programa de Doctorado (CAPD) en Química de la Universidad de Valencia - Programa de Doctorado 3154 en Química (RD 99/2011):

- El núcleo de la tesis está compuesto por tres artículos originales de primer autor (o co-primer autor) publicados en revistas de primer cuartil indexadas al índice internacional *Journal Citation Reports (JCR) database* (Anexo I: Publicaciones).
- La tesis también incluye un resumen global de la temática que consta de un apartado introductorio explicando la coherencia de las publicaciones en el tema, un apartado que contiene los principales resultados encontrados y discusión de éstos, así como un último apartado dónde se establecen las conclusiones generales, justificando la aportación original del doctorando.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- AGE: Productos avanzados de glucosilación
- AKT: Proteína quinasa B, también denominada PKB
- AMP: Adenosina monofosfato
- AP-1: Proteína activadora 1
- ApoB: Apolipoproteína B
- ARE: Elementos de respuesta antioxidante
- ATF4: Factor de transcripción activador 4
- ATF6: Factor de transcripción activador 6
- ATP: Adenosina trifosfato
- BECN1: Beclina 1
- BMI: Índice de masa corporal
- CAM: Moléculas de adhesión celular
- CAT: Catalasa
- CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol
- CHOP: Proteína homóloga de C/EBP
- CoQ10: Coenzima Q 10
- CRP: Proteína C reactiva
- eIF2 α : Factor iniciador de la traducción eucariota 2 α
- eNOS: NO sintetasa endotelial
- ER: Retículo endoplasmático
- ERAD: Sistema de degradación de proteínas asociado al ER
- ET-1: Endotelina 1
- ETC: Cadena de transporte electrónico
- FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
- FFA: Ácidos grasos libres
- GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GFAT: Glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa
- GLUT: Transportador de glucosa
- GPX: Glutación peroxidasa
- GR: Glutación reductasa
- GRP78: Proteína de 78KDa regulada por glucosa
- GSH: Glutación reducido
- GSK3: Glucógeno sintetasa quinasa 3

GSSG: Glutati3n oxidado

H₂O: Agua

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno

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

HBP: Hipertensi3n arterial

HDL(c): Lipoprote3nas de alta densidad (colesterol)

HF1 α : Factor 1 α inducible por hipoxia

HOMA-IR: 3ndice de evaluaci3n de resistencia a la insulina con el modelo homeost3tico

HUVEC: C3lulas endoteliales humanas de cord3n umbilical

ICAM: Mol3culas de adhesi3n intercelular

IGF: Factor de crecimiento insul3nico

I κ B: Inhibidor de la subunidad β de la quinasa de NF κ B

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

IMM: Membrana mitocondrial interna

IR: Resistencia a la insulina

IRE1: Prote3na que requiere inositol

IRS: Sustratos del receptor de insulina

JNK: c-Jun NH₂-terminal

KEAP1: Prote3na 1 asociada a ECH similar a Kelch

LC3: Prote3na de cadena ligera 3 asociada a microt3bulos

LC3-I: Forma citos3lica de LC3

LC3-II: Forma conjugada de LC3

LDL(c): Lipoprote3nas de baja densidad (colesterol)

MitoQ: Mitoquinona

mTOR: Prote3na diana de la rapamicina en mam3feros

NADPH: Nicotinamida adenina dinuce3tido fosfato

NF κ B: Factor nuclear kappa B

NO: 3xido n3trico

NOS: 3xido n3trico sintetasa

NOX: NADPH oxidasa

NRF2: Factor nuclear eritroide 2

\cdot OH: Radical hidroxilo

O₂: Ox3geno molecular

O₂ $^{\cdot -}$: An3n super3xido

OXPPOS: Fosforilación oxidativa

PA-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1

PARP: Poli ADP-ribosa polimerasa

PDE3B: Fosfodiesterasa 3B

PKD1: Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido

PECAM: Molécula de adhesión plaqueto-endotelial

PERK: Quinasa del ER tipo PKR

PGC-1 α : Coactivador 1 α del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5-difosfato

PIP₃: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKC: Proteína quinasa C

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

RAGE: Receptores de productos avanzados de glicosilación

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

SGLT: Transportador de glucosa acoplado a sodio

SIRT1: Sirtuina 1

SOD: Superóxido dismutasa

SS-20: Tetrapéptido de Szeto-Schiller (H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂)

SS-31: Tetrapéptido de Szeto-Schiller (HD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂)

sXBP1: "Spliced XBP1"

T2D: Diabetes mellitus tipo 2

TG: Triglicéridos

TGF- β : Factor de crecimiento transformador- β

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TPP: Cation trifenilfosfonio

TRAF2: Factor 2 asociado al receptor de TNF- α

TXNIP: Proteína que interactúa con la tiorredoxina

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

VCAM: Moléculas de adhesión vascular

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VLDL(c): Lipoproteínas de muy baja densidad (colesterol)

XBP1: Proteína 1 de unión a X-box

SUMARIO

Introducción

La diabetes tipo 2 (T2D) es una enfermedad metabólica caracterizada por la resistencia a la insulina que, junto con una pérdida progresiva de la función de las células β pancreáticas, provoca una alteración del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Como consecuencia, el cuadro clínico que presentan los pacientes con T2D incluye hiperglucemia, dislipidemia, hipertensión, inflamación crónica de bajo grado y aterosclerosis. Aunque en la predisposición a esta enfermedad, hay un importante componente genético, la creciente prevalencia de la T2D parece estar estrechamente relacionada con la obesidad, un estilo de vida sedentario, una dieta hipercalórica y el envejecimiento. Los pacientes con T2D presentan un alto riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares (nefropatía, retinopatía y neuropatía) y complicaciones macrovasculares (enfermedades cardiovasculares como enfermedad arterial coronaria, arteriopatía periférica y accidente cerebrovascular), que pueden limitar sustancialmente su calidad de vida y conllevar daños irreversibles, incluso la muerte.

Por todas estas razones, la T2D se ha convertido en uno de los principales problemas de salud mundial y en el principal reto de salud pública en pleno siglo XXI. Se trata de una de las cuatro enfermedades no transmisibles seleccionadas por los dirigentes mundiales para intervenir con carácter prioritario, pues representa un enorme coste humano, social y económico. El alarmante aumento a nivel mundial de la prevalencia de T2D y la enorme carga de enfermedad asociada, ha generado una creciente demanda de estrategias para frenar la epidemia y/o mitigar sus efectos deletéreos sobre la salud. Para ello se requiere un compromiso firme y sinérgico por parte de los diferentes estamentos sociales, no sólo para desarrollar estrategias preventivas, sino también para contribuir al conocimiento de los eventos patológicos y mecanismos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad, tanto desde el punto de vista básico como clínico.

En este sentido, la mitocondria desempeña un papel crucial en el metabolismo y, por lo tanto, en el progreso de trastornos metabólicos como la T2D. Estos orgánulos son responsables de la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, un proceso que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente cuando la función mitocondrial está dañada. El estrés oxidativo es una de las principales características de los pacientes con T2D, y es el resultado de una producción excesiva de ROS (principalmente debido a la hiperglucemia) que no son contrarrestadas de manera efectiva por las defensas antioxidantes. Por otro lado, la activación del sistema inmunitario y la liberación de citoquinas proinflamatorias son responsables de la inflamación crónica observada en la T2D. Tanto el

estrés oxidativo como la inflamación pueden causar daño a la vasculatura y se consideran mecanismos fisiopatológicos clave involucrados en la aparición y progresión de la T2D y sus complicaciones. Bajo estas circunstancias, las células endoteliales dañadas inducen la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de leucocitos activados hacia la pared vascular. Los leucocitos contribuyen al estrés oxidativo y la inflamación subsiguiente, agravando así la disfunción endotelial y favoreciendo el inicio del proceso aterosclerótico. Por lo tanto, los leucocitos son candidatos clave en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la patogénesis de la T2D, que incluyen, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la inflamación y el estrés del retículo endoplásmico (ER).

Como sensor de estrés, la homeostasis del ER es esencial para preservar la función celular y la viabilidad. Las condiciones patológicas, como el estrés oxidativo, conducen a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas, que alteran la homeostasis del ER y activan la respuesta de la proteína desplegada (UPR) para restablecer su correcta función. Todos estos mecanismos pueden contribuir al aumento de las interacciones leucocito-endotelio en pacientes con T2D.

Asimismo, el uso de antioxidantes con diana en la mitocondria sin duda podría ser una herramienta terapéutica en el control de las enfermedades que conllevan estrés oxidativo y otros mecanismos asociados, mediante la modulación de los procesos moleculares relacionados con la oxidación. Las mitocondrias generan continuamente ROS por lo que su exposición inmediata y prolongada a estas especies hace que los componentes mitocondriales como DNA, proteínas y membranas sean especialmente vulnerables al daño oxidativo.

Objetivos

Teniendo en cuenta todo esto, como objetivo principal de la presente tesis doctoral se pretende profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología de la T2D y estudiar el efecto de los antioxidantes mitocondriales, MitoQ y SS-31, sobre éstos, con un enfoque especial en la activación y reclutamiento de leucocitos hacia la pared vascular, así como el papel de ciertos mecanismos proaterogénicos como la inflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el estrés de ER.

Métodos

Para la consecución de los objetivos propuestos, se reclutaron pacientes con T2D y controles sanos en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia). Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio y los protocolos seguidos fueron aprobados por el Comité de Ética para la

Investigación Clínica de dicho hospital, en línea con los principios éticos de la declaración de Helsinki.

Los sujetos de estudio fueron sometidos a una exploración física para la determinación de parámetros antropométricos (peso, talla, presión arterial, cintura, etc.), y se obtuvieron muestras de sangre en ayunas. Los parámetros bioquímicos del metabolismo hidrocarbonado, perfil lipídico e inflamación se evaluaron en suero mediante métodos de rutina.

A partir de una muestra de sangre periférica, se aislaron leucocitos por separación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, la suspensión celular se dividió para realizar el tratamiento en las mismas condiciones; por una parte, se incubó con SS-31 (100 nM, 30 min) y, por otra, con SS-20 (100 nm, 30 min, sin actividad antioxidante) y se usaron para los experimentos posteriores. Para la evaluación del estado redox se emplearon las siguientes sondas fluorescentes: DCFH-DA, indicativo de la producción total de ROS; MitoSOXTM Red, indicativo de la producción de superóxido mitocondrial; CMFDA, indicador del contenido intracelular de GSH; TMRM, indicativo del potencial de membrana mitocondrial y Fluo-4AM, indicativo del contenido intracelular de calcio. La fluorescencia emitida se cuantificó por el microscopio de fluorescencia (IX81; Olympus) acoplado al software de citometría estática "ScanR". La respiración mitocondrial se evaluó mediante un electrodo de O₂ tipo Clark (Hansatech). La secreción de insulina inducida por glucosa (GIIS) en células β pancreáticas bajo condiciones de gluco- y lipotoxicidad se determinó utilizando un kit ELISA de insulina (Mercodia AB, Uppsala, Suecia).

Los ensayos de interacción leucocito-endotelio se llevaron a cabo utilizando una cámara de flujo paralela. En este sistema se perfundió una suspensión de leucocitos sobre una monocapa de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, aisladas mediante un tratamiento con colagenasa) en condiciones de temperatura y velocidad que simulan las del flujo sanguíneo. La interacción de los leucocitos con la monocapa endotelial se observó a través de un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TE2000-S) y las imágenes se grabaron en tiempo real con una cámara acoplada (Sony Exware HAD) y, posteriormente, se analizaron para calcular la velocidad de rodamiento, el flujo y la adhesión leucocitaria. Finalmente, se realizó la extracción de RNA y proteínas totales y se evaluaron los niveles de defensas antioxidantes, parámetros inflamatorios y de estrés de ER mediante RT-qPCR y Western Blot. El análisis estadístico se realizó mediante los programas SPSS 17.0 y Graphpad Prism 5.0.

Resultados y Discusión

Los pacientes con T2D mostraron una homeostasis de la glucosa alterada, con niveles más altos de glucosa en ayunas, HbA_{1c}, insulina y HOMA-IR que los controles. Nuestra población diabética se caracterizó por presentar sobrepeso u obesidad, con un índice de masa corporal (BMI) y perímetro de cintura aumentados en comparación con el grupo control. Además, el aumento en los niveles de proteína C reactiva observados en pacientes con T2D con respecto a los controles sugirieron una inflamación sistémica de bajo grado, probablemente debido al exceso de peso, ya que estas diferencias desaparecieron después del ajuste por BMI. Los pacientes con T2D tenían presión arterial más elevada que los controles, y casi la mitad estaban recibiendo terapia antihipertensiva. También se observó un perfil lipídico alterado en pacientes con T2D, con concentraciones elevadas de triglicéridos y reducidas de colesterol HDL en comparación con la población control, que son características típicas de la dislipemia aterogénica. Los niveles más bajos de colesterol total y LDL con respecto a los controles probablemente se atribuyeron al tratamiento antihiperlipidémico seguido por la mayoría de nuestros pacientes diabéticos.

Al profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología de la T2D, hemos observado que existe una alteración del sistema inmune y cambios en el estado de activación y número de leucocitos circulantes. Nuestros hallazgos parecen indicar que los leucocitos de pacientes con T2D tienden a frenarse cuando se acercan a las células endoteliales, y en consonancia, también se ha observado un incrementado número de leucocitos que permanecen adheridos al endotelio en pacientes con T2D. Una vez activados, los leucocitos son capaces de producir y liberar gran cantidad de ROS contribuyendo al estrés oxidativo y a la subsecuente inflamación y disfunción endotelial. Tras evaluar por microscopía de fluorescencia la producción de ROS y los niveles de GSH en leucocitos aislados de los sujetos de estudio, observamos que los pacientes con T2D presentaban un aumento en la producción de ROS, tanto totales como mitocondriales, y menor concentración intracelular de GSH en comparación con los leucocitos de controles sanos, apuntando a una alteración del estado redox.

Los antioxidantes juegan un papel clave ya que neutralizan los radicales libres implicados en el estrés oxidativo e impiden su propagación. El antioxidante ideal debe ser permeable a las células y ser capaz de alcanzar las mitocondrias para protegerlas del daño oxidativo. En la presente tesis, estudiamos en primer lugar los efectos del MitoQ, uno de los antioxidantes mitocondriales más reconocidos dado que es biocompatible y se puede administrar *in vivo* de forma segura. El MitoQ es una quinona similar al coenzima Q10 (CoQ10), un potente antioxidante liposoluble que procede de la dieta pero también es sintetizado por el propio

organismo. CoQ10 se distribuye extensamente a través de la célula, sin embargo, el antioxidante MitoQ apunta específicamente a la mitocondria siendo el objetivo de su estudio, combatir el daño oxidativo desde el origen. Tras evaluar el efecto del tratamiento de leucocitos aislados con el antioxidante mitocondrial MitoQ, nuestros resultados mostraron una reducción significativa en la producción mitocondrial de ROS, aumento en los niveles de expresión proteica de GPX1, y disminución de las interacciones con las células endoteliales (velocidad de rodamiento aumentada, y flujo de rodamiento y adhesión reducidos) en leucocitos de pacientes con T2D versus leucocitos de sujetos control.

Para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la patología de la T2D y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento, decidimos estudiar también en mayor profundidad cómo las propiedades antioxidantes de otro compuesto dirigido a la mitocondria, como es el SS-31 de la familia de péptidos Szeto-Schiller, afectan al comportamiento de los leucocitos de los pacientes con T2D. El SS-31 es un pequeño tetrapéptido soluble en agua y permeable a las células que se une mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas específicamente a la cardiolipina, un fosfolípido esencial que preserva la estructura y la función adecuada de la membrana mitocondrial interna, concentrándose de manera independiente del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y modulando la función mitocondrial, eliminando ROS e inhibiendo la transición de la permeabilidad mitocondrial. De nuevo, nuestros resultados respaldan la capacidad antioxidante del SS-31 ya que el tratamiento de leucocitos de pacientes diabéticos redujo de forma significativa los elevados niveles de ROS totales y mitocondriales encontrados en estos pacientes en comparación con los controles. También evaluamos el $\Delta\Psi_m$ y el contenido de GSH mediante microscopia de fluorescencia. En ambos casos, observamos que el tratamiento con SS-31 restauró la expresión de estos parámetros en leucocitos de pacientes diabéticos hasta los niveles observados en leucocitos de sujetos sanos. Por otro lado, nuestros resultados muestran que el antioxidante SS-31 también fue capaz de modular significativamente las interacciones leucocito-endotelio en pacientes con T2D, aumentando la velocidad de rodamiento de los leucocitos y disminuyendo el flujo de rodamiento y su adhesión sobre el endotelio.

Nuestros trabajos también sugieren que bajo condiciones de estrés oxidativo se induce la activación de NF κ B, promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias. Así pues, evaluamos los niveles de expresión proteica de NF κ B y TNF α , observando una correlación positiva entre los niveles de NF κ B y glucosa, lo cual confirma que la hiperglucemia está estrechamente asociada con la inflamación. Los niveles elevados de NF κ B y TNF α presentes en leucocitos de pacientes diabéticos se redujeron significativamente tras el

tratamiento con ambos antioxidantes mitocondriales estudiados, MitoQ y SS-31. Existen evidencias de que la señalización de NFκB también puede controlar los cambios metabólicos y el equilibrio energético en coordinación con SIRT1, un importante regulador del metabolismo energético y la supervivencia del tejido. SIRT1 puede detectar los cambios en la disponibilidad de nutrientes y en el ratio NAD⁺/NADH, y responde a ellos reprogramando las rutas metabólicas, inmunitarias y bioenergéticas. En asociación con una disminución en la señalización de NFκB, la producción de ROS y las interacciones leucocito-endotelio, los resultados presentados revelan una regulación positiva de SIRT1 en leucocitos de pacientes diabéticos tratados con el antioxidante mitocondrial SS-31. En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de T2D podría estar aumentando el riesgo de desarrollar aterosclerosis en estos pacientes, entre otros, a través de la exacerbación de la respuesta inflamatoria y oxidativa. Nuestros resultados evidencian el papel clave que el estrés oxidativo ejerce sobre el endotelio durante la T2D y sugieren que la suplementación con estos antioxidantes mitocondriales podría suponer una estrategia para modular y aliviar las complicaciones vasculares asociadas a la T2D.

En la realización de este estudio a nivel molecular y fisiológico de la T2D, consideramos que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que impulsen la funcionalidad de las células β pancreáticas sería esencial para el tratamiento de esta enfermedad ya que, durante su inicio, la homeostasis de la glucosa se altera debido al deterioro de la respuesta compensatoria de las células β. De hecho, para proceder a evaluar el alcance de los efectos potencialmente beneficiosos del antioxidante mitocondrial MitoQ en esta dirección, empleamos células β pancreáticas INS-1E, que reproduce estrechamente la función de los islotes pancreáticos y tiene alta capacidad de respuesta estable a la glucosa siendo de gran utilidad para estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la secreción de insulina. Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman que bajo condiciones de hiperglucemia, las células β pancreáticas presentan un aumento en la producción de ROS, tanto mitocondriales como totales, un descenso en los niveles intracelulares de GSH y un incremento en la tasa de consumo de O₂ mitocondrial, lo que apunta a una alteración de la función mitocondrial y nos lleva a plantear la hipótesis de que, por tanto, el tratamiento dirigido a este orgánulo podría tener potencial efectividad terapéutica protegiendo eficazmente contra el daño oxidativo desde su origen. Las células β pancreáticas son particularmente susceptibles al daño por ROS debido a su reducida expresión de enzimas antioxidantes y, en relación con esto, los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con MitoQ reduce significativamente el consumo de O₂ mitocondrial en condiciones de hiperglucemia, así como la producción de ROS totales y

mitocondriales, y modula el contenido intracelular de GSH, por lo que ejerce un efecto antioxidante. Además, la administración de MitoQ a células β pancreáticas bajo elevadas concentraciones de glucosa, incrementa de forma significativa la secreción de insulina, lo que sugiere una mejora de su funcionalidad.

Junto al estrés oxidativo, entre los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la T2D se encuentra el estrés de ER, que parece jugar un papel fundamental en la inhibición de la acción de la insulina en tejidos periféricos. Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de GRP78 en células β están aumentados bajo condiciones de hiperglucemia, confirmando un aumento del estrés de ER asociado al desarrollo de la T2D. Tras la inducción de la UPR, la producción de la chaperona molecular GRP78 aumenta drásticamente como un mecanismo para aumentar la capacidad de plegamiento del ER. Además, bajo estas condiciones de hiperglucemia también observamos elevados niveles de P-eIF2 α indicando una activación de la ruta de PERK para atenuar la traducción de proteínas. Curiosamente, la evaluación de dichos parámetros tras el tratamiento de las células β con el antioxidante mitocondrial MitoQ, mostró una significativa reducción en la expresión de GRP78 y del principal mediador de la ruta PERK, sugiriendo que el tratamiento podría modular esta respuesta adaptativa que se activa bajo el daño oxidativo al que conlleva la condición de hiperglucemia que caracteriza a la T2D. En consonancia con estos hallazgos, las alteraciones observadas en el almacenamiento de Ca²⁺ intracelular en respuesta a los niveles elevados de glucosa también fueron restauradas por el MitoQ. A su vez estos ROS mitocondriales, al ser transferidos al lumen del ER, pueden interferir en el adecuado plegamiento de proteínas cronificando la situación de estrés. Si este mecanismo de retroalimentación se prolonga, ambos orgánulos inician rutas de apoptosis conjuntas que pueden conducir a la muerte celular.

Nuestros resultados sugieren que la suplementación con MitoQ podría estar mejorando la homeostasis celular y la funcionalidad del ER y la mitocondria, puesto que un descenso de los marcadores de estrés de ER se acompañó de un descenso de los niveles de Ca²⁺ y producción de ROS mitocondriales. Además, las tres rutas de la UPR están ligadas a la señalización inflamatoria a través de la activación de NF κ B y el tratamiento de las células INS-1E con el antioxidante mitocondrial MitoQ redujo, de forma notable, la elevada expresión del factor proinflamatorio NF κ B en condiciones de hiperglucemia. El estrés de ER se postula como una diana terapéutica relevante dentro de la fisiopatología de la T2D, puesto que se asocia con la mejora de otras respuestas al estrés celular y alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y la inflamación sistémica.

En conjunto, los hallazgos de la presente tesis doctoral apoyan la participación del estrés oxidativo, la disfunción endotelial y el estrés de ER en la fisiopatología de la T2D y sugieren un papel clave de estos procesos en el desarrollo de complicaciones vasculares. Además, nuestros resultados sugieren que el tratamiento de leucocitos de pacientes con T2D con antioxidantes mitocondriales tales como MitoQ y SS-31, modulan diferentes vías de estrés celular (como estrés oxidativo y la UPR) por las que el tratamiento con estos antioxidantes dirigidos a la mitocondria podría modular la señalización celular en los leucocitos promoviendo una disminución de sus interacciones con el endotelio, y retrasando así el desarrollo del proceso aterosclerótico.

RESUMEN GLOBAL

1. TEMÁTICA

1.1. Diabetes mellitus tipo 2

1.1.1. Definición

La diabetes mellitus tipo 2 (T2D, del inglés *type 2 diabetes*) es un trastorno metabólico caracterizado por elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) y que, generalmente, resulta de un defecto en la secreción de insulina asociada a resistencia a la insulina (IR, del inglés *insulin resistance*).

Esta enfermedad se asocia con frecuencia a múltiples alteraciones metabólicas, entre las que cabe destacar la dislipemia, obesidad o hipertensión, las cuales, además, favorecen una inflamación crónica de bajo grado, conduciendo a toda una serie de complicaciones micro- y macrovasculares. Se trata de una compleja enfermedad de naturaleza crónica que requiere continuos cuidados médicos, educación del paciente y diversas estrategias para poder minimizar los factores de riesgo.

1.1.2. Criterios diagnósticos

Para el diagnóstico de la diabetes generalmente se recurre a la determinación de los niveles de glucosa plasmática en ayunas; entendiéndose el ayuno como la ausencia de aporte calórico durante al menos 8 horas. La determinación de la hemoglobina glicosilada A1C (HbA_{1c}), que proporciona información sobre los niveles medios de glucosa en sangre de las últimas 8-12 semanas,¹ y la realización de una sobrecarga oral de glucosa pueden emplearse, tanto para su diagnóstico como para el cribado de los pacientes. Los criterios diagnósticos de la diabetes propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA, del inglés *American Diabetes Association*) están relacionados con el control glucémico y consisten en el cumplimiento de cualquiera de las siguientes condiciones:²

- Niveles plasmáticos de glucosa en ayunas ≥ 126 mg/dl
- Niveles aleatorios de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl
- Valores de HbA_{1c} $\geq 6,5$ %
- Glucemia plasmática a las 2 horas del test de sobrecarga oral a la glucosa ≥ 200 mg/dl

1.1.3 Epidemiología

En pleno siglo XXI, la T2D constituye un gran problema de salud mundial y uno de los principales retos para la salud pública. Durante las últimas décadas su incidencia ha ido en aumento en todo el mundo de forma alarmante y actualmente alcanza proporciones epidemiológicas. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *world health organization*), desde 1980 la

prevalencia mundial de la diabetes (normalizada por edades) prácticamente se había duplicado en el año 2014, pasando de un 4,7 % al 8,5 % de la población adulta (personas entre 20 y 79 años), siendo este aumento más marcado en los países en desarrollo. Siguiendo la tendencia actual, y según los datos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, del inglés *interantional diabetes federation*), 629 millones de personas se verán afectadas por esta enfermedad para el año 2045, esto es, aproximadamente 3 casos nuevos cada 10 segundos.³ En este sentido, y aunque no se dispone de estimaciones mundiales separadas sobre la prevalencia de la diabetes, se puede asumir que aproximadamente el 90 % de todos los casos corresponderían a la T2D.

Es ampliamente conocido que en el desarrollo de la T2D existe predisposición genética, aunque también se ha demostrado a su vez, que el riesgo de padecer esta enfermedad aumenta con la edad, la obesidad y un estilo de vida sedentario.⁴ Considerada tradicionalmente como una enfermedad de adultos, el aumento en las tasas de obesidad ha favorecido en paralelo el diagnóstico de la T2D entre la población infantil y los adultos jóvenes. Además, determinados grupos étnicos, como es el caso de afroamericanos, latinos/hispanos, indígenas de Hawai o americanos, isleños del pacífico o estadounidenses de origen asiático parecen estar también en mayor riesgo.⁵

La T2D es una de las cuatro enfermedades no transmisibles seleccionadas por los dirigentes mundiales para intervenir con carácter prioritario, pues representa un enorme coste humano, social y económico. Ya en 2015 fue considerada como la sexta causa de discapacidad en el mundo y es una de las principales causas de morbilidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo.⁶ Cuanto más tiempo se tarda en diagnosticar la T2D, peores pueden ser las consecuencias para la salud. En este sentido, es muy importante una adecuada capacidad de prevención y control, así como la derivatización facultativo-especialista y viceversa, ya que, en caso de complicaciones, los pacientes necesitan evaluación o tratamientos periódicos especializados. Por todo esto, uno de los datos más preocupantes es que, según la IDF, cerca de la mitad de personas con diabetes no están diagnosticadas y, por tanto, estarán expuestas a las complicaciones de la diabetes en los próximos años sin ser conscientes de ello.

1.1.4. Fisiopatología

1.1.4.1. Papel de las células β en la homeostasis de la glucosa

Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía del organismo, pero la glucosa plasmática proviene no solo de la dieta, sino también de la glucogenolisis y la

gluconeogénesis, procesos recientemente revisados en profundidad por Roder y colaboradores.⁷ Dado que el consumo energético varía con factores como la edad, sexo, peso, estatura y actividad física, el organismo cuenta con una gran red de hormonas y neuropéptidos perfectamente coordinados para controlar los niveles de glucosa en sangre y mantenerlos en rango fisiológico (70-110 mg/dl). Un adecuado control de este proceso de homeostasis de la glucosa es esencial para los mamíferos y en él participan principalmente órganos como el páncreas, el intestino, el hígado o el cerebro, y tejidos como el muscular y el adiposo (Figura 1).

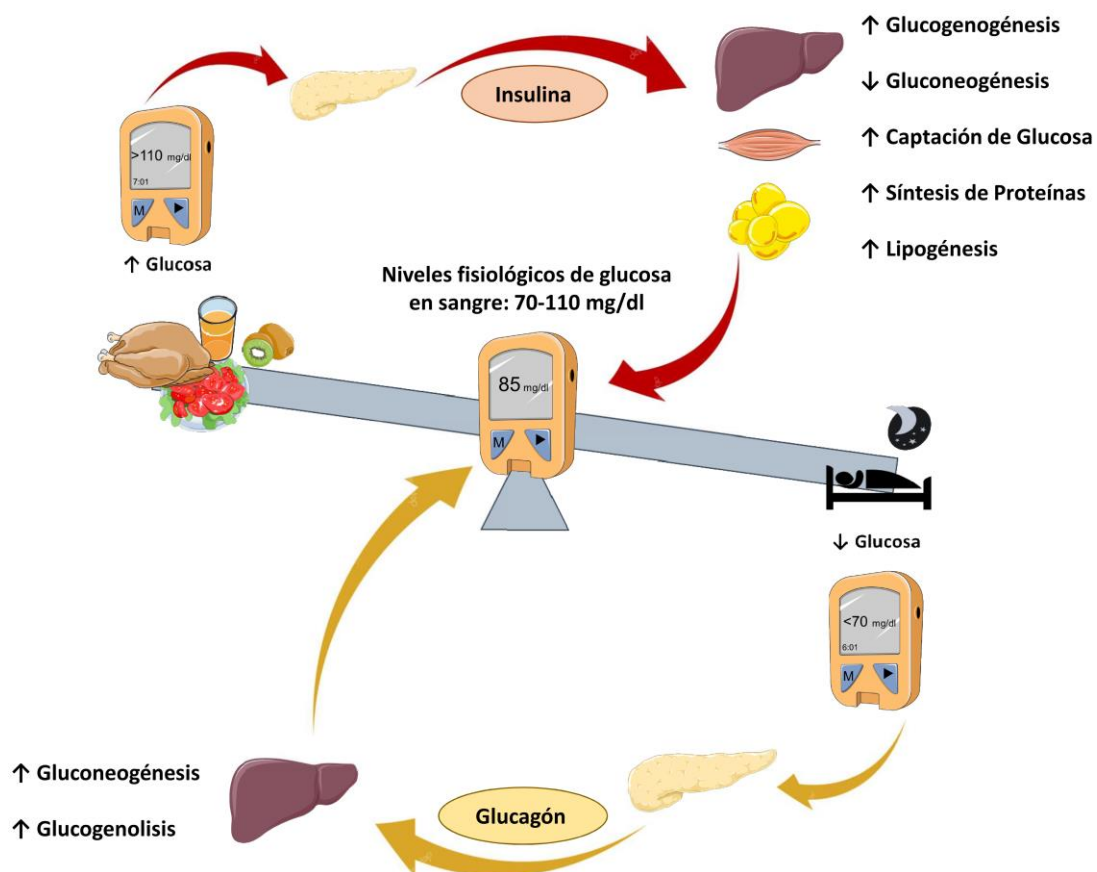


Figura 1. Insulina, glucagón y homeostasis de la glucosa. En estado de ayuno, los niveles plasmáticos de glucosa descienden, el páncreas secreta glucagón, lo que contribuye al incremento de la glucoenergésis hepática y la gluconeogénesis, aumentando así los niveles circulantes de glucosa. Sin embargo, tras la ingesta de alimentos se produce la absorción de nutrientes en el tubo digestivo incrementándose los niveles plasmáticos de glucosa. Para promover la utilización de glucosa por parte de los tejidos periféricos, el páncreas libera insulina. Al mismo tiempo, la insulina inhibe la gluconeogénesis hepática y estimula la síntesis de glucógeno. A través de estos procesos los niveles de glucosa plasmática en seres humanos sanos se mantienen en un estrecho rango fisiológico de 70-110 mg/dl.

Aunque el páncreas es una glándula endocrina fundamental, sólo el 1-2 % de su peso está constituido por células secretoras de hormonas y éstas se agrupan en los llamados islotes de Langerhans. Cada islote tiene una población de células α , que producen la hormona glucagón, y una población de células β , que producen la hormona insulina (Figura 2). Se trata de dos hormonas antagónicas que regulan la concentración de glucosa en sangre.

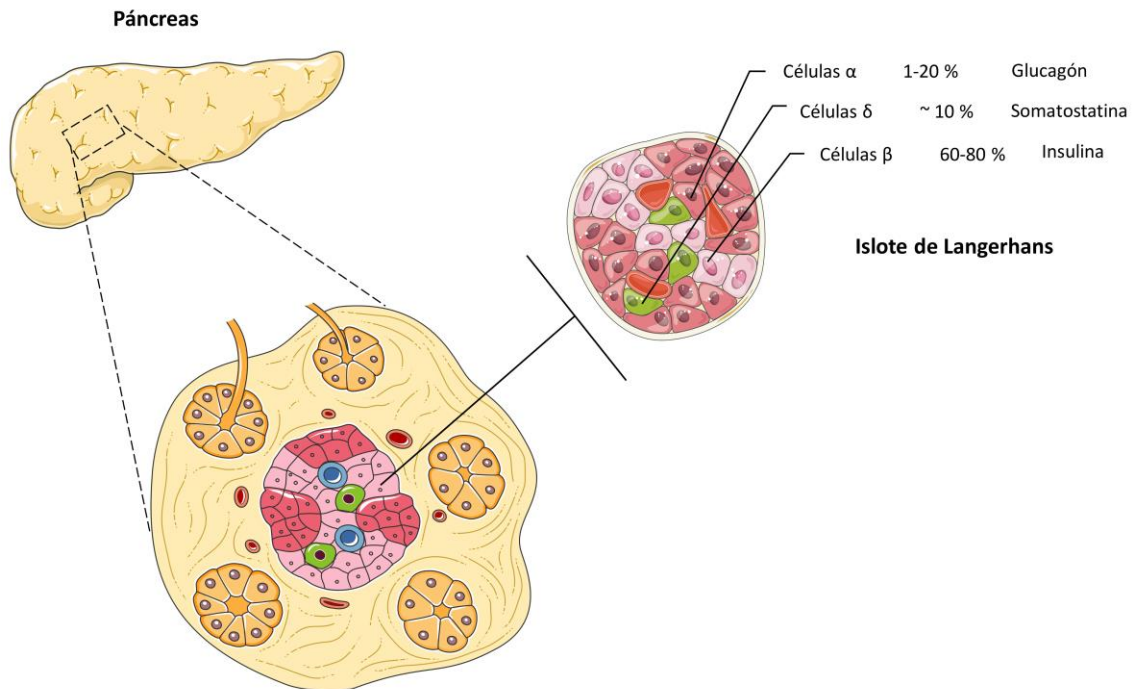


Figura 2. Islote de Langerhans. Distribución topográfica y porcentajes de las distintas células que conforman el islote pancreático, una agrupación de células (α , β y δ) que se distribuyen en el interior del órgano, fabricando y liberando a la circulación tres hormonas (glucagón, insulina y somatostatina) que modulan la concentración de la glucosa en la sangre.

En condiciones normales, tras el proceso digestivo, los nutrientes son absorbidos en el intestino principalmente como glucosa y liberada a la circulación, desde donde es captada por distintos tejidos, como el muscular, que a través de su consumo representa el principal regulador de los niveles de glucosa. El transporte de glucosa a través de las membranas celulares requiere de proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT) y de los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT, del inglés *sodium glucose transporters*) que permiten el equilibrio entre las concentraciones de glucosa extra e intracelulares. El transporte de glucosa en las células β se produce a través del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2). Las características de las células β les confieren la capacidad de secretar insulina de forma rápida y eficaz, adaptándose a las fluctuaciones de las concentraciones de glucosa circulante. En el hígado, la insulina favorece el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno (glucogenogénesis) e

inhibe la conversión hepática de glucógeno (gluconeogénesis), aminoácidos y grasas en glucosa. Por tanto, el hígado juega un papel clave como sensor de glucosa. Además, sólo las células hepáticas son sensibles al glucagón secretado por las células α pancreáticas, y cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos en condiciones de ayuno, el glucagón envía señales a los hepatocitos para aumentar la hidrólisis de glucógeno y favorecer la gluconeogénesis.

La insulina, al unirse a su receptor específico, localizado en la membrana plasmática de las células diana, permite la captación de glucosa por los tejidos diana (músculo, tejido adiposo e hígado). El receptor específico de la insulina es una proteína transmembrana heterotetramérica que pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa, y una vez activado mediante un proceso de autofosforilaciones cruzadas, es capaz también de fosforilar a los sustratos del receptor de insulina (IRS, del inglés *insulin receptor substrates*). En este sentido, se ha descrito que los IRS (de los cuales hay cuatro: IRS1, IRS2, IRS3 y IRS4), una vez fosforilados, son capaces de reclutar proteínas señalizadoras que traducen la señal de la insulina de manera específica en función del tejido y del entorno celular. Por ejemplo, los efectos metabólicos de la insulina son dependientes principalmente de la activación de la ruta fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). PI3K fosforila fosfolípidos de membrana siendo uno de los principales productos el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), pero además IRS1 fosforilado activa la subunidad catalítica de la PI3K, que convierte el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en PIP₃. Así, PI3K es el origen de una cascada de transducción de señales iniciada por la acumulación de PIP₃ permitiendo la activación de la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido (PDK1), que a su vez fosforila y activa la proteína quinasa B (PKB, también conocida como AKT) la cual se considera 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,⁸ respectivamente al participar en la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) desde las vesículas intracelulares a la membrana plasmática,^{9,10} en la síntesis de glucógeno a través de su acción sobre la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3),¹¹ en la síntesis de proteínas mediante la activación de la ruta mTORC1/p70S6K,¹² y en la acción anti-lipolítica de la insulina tras la fosforilación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) y el descenso en los niveles de monofosfato de adenosina (AMP, del inglés *adenosine monophosphate*) cíclico.¹³

1.1.4.2. Resistencia a la insulina

Existe una conexión bidireccional entre las células β pancreáticas y los tejidos sensibles a la insulina que resulta esencial para una correcta homeostasis de los niveles de glucosa. Sin embargo, en el desarrollo de la T2D las células pierden la capacidad para responder

correctamente a la acción hipoglucemiante de la insulina (Figura 3), lo que se denomina como IR.¹⁴ Bajo estas condiciones se produce una reducción en la captación de glucosa en los tejidos adiposo y muscular¹⁵ y una mayor liberación de ácidos grasos libres (FFA, del inglés *free fatty acids*) procedentes fundamentalmente del tejido adiposo,¹⁶ que promueven la gluconeogénesis hepática con el consiguiente incremento de los niveles de glucosa en sangre. A pesar de la hiperglicemia, en esta situación sistémica las células no pueden absorber ni metabolizar la glucosa. A su vez, estos FFA se acumulan a nivel hepático y muscular dando lugar a la inhibición de la actividad piruvato deshidrogenasa y favoreciendo la síntesis hepática de triglicéridos (TG, del inglés *triglycerides*), lo que a la larga genera una situación de hiperlipidemia.¹⁷

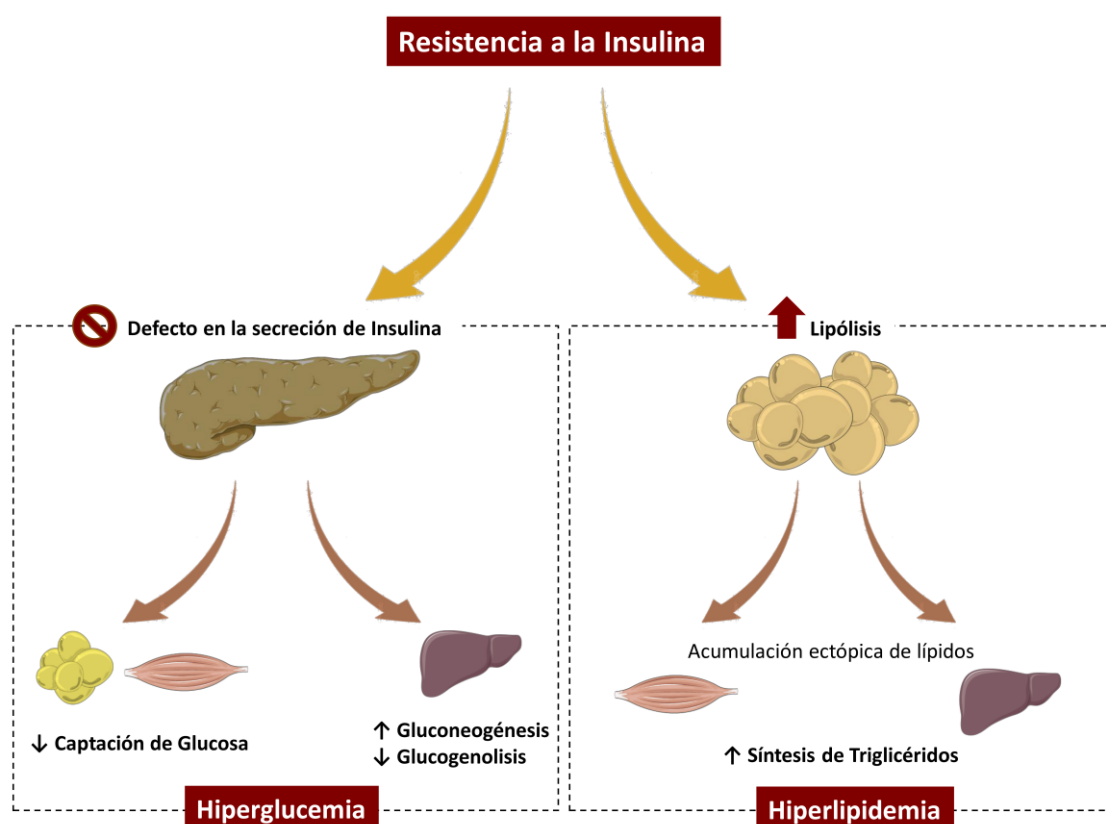


Figura 3. Mecanismos asociados a la resistencia a la insulina (IR). Cuando la señalización de la insulina se ve alterada, el páncreas incrementa su producción como un mecanismo compensatorio. Sin embargo, la IR en hígado y tejidos periféricos provoca un aumento de los niveles circulantes de glucosa y, 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 IR y promoviendo la hiperlipidemia.

1.1.4.3. Función/Disfunción β pancreática

La alteración en la funcionalidad de las células β pancreáticas no solamente es esencial en la aparición de la T2D, sino que parece ser de gran importancia en la evolución de esta

enfemedad. La T2D progresa con un continuo empeoramiento en la respuesta a la insulina. Al principio se produce una IR periférica, si bien, los niveles óptimos de glucosa se mantienen gracias a un *feedback* regulador de la producción de insulina (hiperinsulinemia) por parte de las células β pancreáticas. Sin embargo, cuando la situación se cronifica, la demanda de insulina supera la capacidad de síntesis de estas células, y comienza su destrucción gradual conduciendo a la disfunción celular y, finalmente, a la activación de los mecanismos de apoptosis.¹⁸ El resultado de estas alteraciones es una reducción en la secreción de insulina, una intolerancia a la glucosa y, como consecuencia, un estado de hiperglucemia y, finalmente, el desarrollo de T2D. Además, la alteración de esta función puede desencadenar una liberación excesiva de glucagón y progresión de la hiperglucemia durante los estados de ayuno y postprandial.^{19,20}

En la patogénesis de la T2D existen dos elementos esenciales: la IR y los defectos en la función de las células β pancreáticas. La secuencia temporal en la que aparecen, la magnitud de ambos o incluso los mecanismos intrínsecos que subyacen en ellos, son cuestiones que siguen sin resolverse y generan gran controversia puesto que ambos factores están relacionados de forma intrínseca y son interdependientes.

1.1.5. Comorbilidades asociadas a la T2D: manifestaciones clínicas

Numerosos estudios han demostrado de forma clara que los sujetos con T2D tienen un mayor riesgo de desarrollar varias complicaciones metabólicas que contribuyen significativamente al deterioro de la calidad de vida relacionada con la salud y al aumento de la tasa de mortalidad.²¹

1.1.5.1. Sobrepeso y Obesidad

La obesidad es el principal factor etiopatogénico ambiental causante de la T2D por lo que están estrechamente relacionadas. La obesidad se define como una enfermedad metabólica crónica caracterizada por una acumulación excesiva de grasa. El aumento en el almacenamiento de lípidos produce una disfunción del tejido adiposo, que suele ir acompañada de una cascada de efectos sistémicos deletéreos, como la inflamación crónica de bajo grado, la dislipidemia y la respuesta alterada a la insulina, entre otras anomalías metabólicas, y se asocia con un deterioro de la salud.

Hasta la fecha, se han diseñado varios métodos para determinar la presencia y el alcance de la obesidad, incluidas determinaciones específicas de la masa grasa de un individuo, como densitometría ósea, impedancia bioeléctrica o escáneres corporales, y evaluaciones basadas en la antropometría, como el índice de masa corporal (BMI, del inglés *body mass index*), perímetro de la cintura, relación cintura-cadera o evaluación de pliegues cutáneos. De todos estos

parámetros, en la práctica diaria en todo el mundo el BMI es el más utilizado para diagnosticar y clasificar la obesidad por su simplicidad y reproducibilidad.²² El BMI es una medida indirecta de la adiposidad, obtenida al dividir el peso en kilogramos por la altura en metros al cuadrado (kg/m^2). La clasificación de la obesidad basada en el BMI fue establecida por la WHO y define la desnutrición como un BMI $< 18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$, el normopeso como un BMI $18,5\text{-}24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, sobrepeso como un BMI $25\text{-}29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, obesidad grado I como un BMI $30\text{-}34,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, obesidad grado II como un BMI $35\text{-}39,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ y obesidad grado III o obesidad mórbida como un BMI $> 40 \text{ kg}/\text{m}^2$ en la edad adulta.²³

En el momento en el que se diagnostica la T2D, la mayoría de los sujetos presenta sobrepeso u obesidad y si bien es cierto que esto se considera el factor de riesgo individual más importante,²⁴ este parámetro es un indicador general de la adiposidad total pero no es lo suficientemente preciso como para reflejar la cantidad y la distribución de la grasa corporal en un individuo.²⁵ En este sentido, el patrón de acumulación de grasa corporal (abdominal o periférica) tiene especial relevancia en el desarrollo de comorbilidades. Por ejemplo, se ha demostrado que la obesidad abdominal, donde la acumulación de grasa es predominantemente mesentérica y visceral, predice el riesgo de T2D independientemente del BMI y se sabe que en personas con un mismo BMI las que tienen mayor edad tienden a tener mayor composición de grasa abdominal,²⁶ por tanto la evaluación de riesgo a través del BMI puede llegar a ser menos exacta a ciertas edades.²⁷ Por todo ello, se han propuesto otras medidas antropométricas como el perímetro de cintura, debido a su fuerte correlación con los depósitos de grasa visceral para definir con mayor precisión el riesgo asociado con la obesidad.²⁸ Actualmente, los valores de referencia del consenso NECP-ATPIII (por sus siglas en inglés, *National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III*) son $\geq 102 \text{ cm}$ para los hombres y $\geq 88 \text{ cm}$ para las mujeres, lo que indica obesidad abdominal y un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad.²⁹

Los trastornos metabólicos que caracterizan a la obesidad reflejan una alteración bioquímica y funcional de los tejidos dependientes de la insulina que a largo plazo puede conducir a una pérdida de compensación. Es entonces cuando de forma paralela, aparecen alteraciones en la tolerancia a la glucosa y la IR. De esta manera, la obesidad da lugar a un aumento en la cantidad de FFA en sangre y, por tanto, de la captación de éstos por el músculo, hígado y tejido adiposo. Los FFA pueden ser almacenados u oxidados en la mitocondria, pero cuando se excede la capacidad y se desarrolla una acumulación ectópica de lípidos se inhibe la ruta de la insulina, induciendo por lo tanto IR.³⁰ En esos casos los FFA proporcionan energía al músculo en detrimento de la glucosa, lo que provoca un aumento de la glucemia.

El páncreas secreta insulina en exceso para intentar reducir la elevada glucemia, lo que termina conduciendo al colapso de las células β , incapaces de producir suficiente insulina y, entonces, se produce la hiperglucemia y también se desarrolla la IR que tras el progresivo deterioro de las células β conduce a la aparición de la T2D. Además, 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 , del inglés *tumor necrosis factor α*) inhibiendo la señalización de la insulina mediante la inactivación y degradación de IRS-1.³¹ Desde un punto de vista fisiopatológico, la IR parece ser un denominador común a las diferentes complicaciones metabólicas de la obesidad.

Cabe destacar que el tejido adiposo es capaz de modular el metabolismo mediante la liberación de FFA, glicerol, citoquinas proinflamatorias y hormonas.^{32,33} Además, el creciente conocimiento sobre el papel de los adipocitos en la inflamación y sistema inmune se ha relacionado con la predisposición al desarrollo y progresión de una gran variedad de complicaciones con el considerable efecto deletéreo sobre la salud que, sin duda, proyectan un potencial incremento sobre la morbimortalidad.

1.1.5.2. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HBP, del inglés *high blood pressure*) es el incremento continuado de las cifras de presión arterial sanguínea por encima de los límites sobre los que incrementa el riesgo cardiovascular. Las últimas directrices de la Sociedad Europea de Hipertensión recomiendan como objetivo de tensión arterial en los diabéticos unas cifras entre 130-139/80-85 mmHg. La prevalencia de HBP en la diabetes es aproximadamente el doble que en la población normoglucémica y habitualmente la HBP ya está presente en el momento de diagnóstico de la T2D incluso antes que ésta se desarrolle. En este sentido, se estima que alrededor del 30 % de los pacientes con T2D son ya hipertensos cuando se detectan las primeras cifras anormales de glucosa en sangre. Además, los pacientes con HBP a menudo exhiben IR y tienen un mayor riesgo de desarrollar T2D que los individuos normotensos.³⁴

La principal causa de morbilidad y mortalidad en la T2D es la enfermedad cardiovascular, que se ve agravada por la HBP. En consecuencia, la diabetes y la HBP están estrechamente vinculadas debido a factores de riesgo similares, como disfunción endotelial, inflamación vascular, remodelación arterial, aterosclerosis, dislipidemia y obesidad. También hay una superposición sustancial en las complicaciones cardiovasculares de la diabetes y la HBP relacionadas principalmente con la enfermedad micro- y macrovascular. Los mecanismos comunes, como la regulación positiva del sistema renina-angiotensina-aldosterona, el estrés oxidativo, la

inflamación y la activación del sistema inmunitario probablemente contribuyen a la estrecha relación entre la diabetes y la HBP. En el manejo de la T2D, la HBP es un factor de riesgo añadido para el desarrollo de complicaciones macro- y microvasculares por lo que su control para mantenerla dentro del rango óptimo en estos pacientes es fundamental para reducir el riesgo de morbilidad asociado.³⁴⁻³⁶

1.1.5.3. Dislipemia aterogénica

La dislipemia se define como un trastorno cualitativo y/o cuantitativo de los niveles en sangre de lípidos y lipoproteínas con potencial acción aterogénica. Se puede establecer una clasificación en función de si tiene origen genético, dislipemia primaria o si está asociada a otra enfermedad, dislipemia secundaria. Por ejemplo, en pacientes con T2D se presenta un metabolismo lipídico alterado a causa de la IR. En el caso de la dislipemia diabética existe una hipertrigliceridemia acompañada de reducidos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumento leve-moderado en niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y elevados niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), apolipoproteína B (ApoB) y FFA.³⁷ Debido a la falta de acción supresora de la insulina, los pacientes con T2D presentan un perfil lipídico caracterizado por elevada liberación de FFA en el tejido adiposo y una reducida degradación de ApoB en el hígado.³⁸ De este modo, la IR a través de una sobrecarga hepática de FFA promueve a través de enzimas lipogénicas una sobreproducción de VLDL enriquecidas en TG y con alta capacidad aterogénica que a su vez inducen el incremento en la concentración de ApoB, aumento de las partículas LDL pequeñas y densas y la expresión de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP, del inglés *cholesteryl ester transfer protein*) permitiendo la transferencia de lípidos entre lipoproteínas.³⁹ Las partículas ricas en colesterol HDL ceden ésteres de colesterol a las lipoproteínas con ApoB (VLDL, LDL) y, a su vez, éstas transfieren TG a las HDL. Los TG de estas partículas HDL resultantes son hidrolizados por la lipasa hepática dando lugar a partículas HDL pequeñas y con bajo contenido en colesterol. Algunos estudios han demostrado que las lipoproteínas ricas en TG juegan un papel clave en el desarrollo de enfermedad arterial coronaria a pesar de que los TG por sí mismos no están implicados en el desarrollo de la placa aterosclerótica.⁴⁰

En este sentido, se ha demostrado que existe una relación directa entre dislipemia y enfermedad arteriosclerótica, tanto en población general como en diabéticos,⁴¹ pero dado que la prevalencia de la dislipemia es 2-3 veces mayor entre los pacientes diabéticos, la dislipidemia aterogénica se considera uno de los factores de riesgo cardiovascular más importantes. A pesar de que los niveles elevados de LDL constituyen el principal factor pronóstico de riesgo

cardiovascular, se ha demostrado que a niveles similares de colesterol LDL (incluso dentro de objetivo terapéutico), aquellos pacientes con T2D que presentan mayor proporción de partículas de LDL pequeñas y densas tienen más riesgo cardiovascular.⁴² Por este motivo las principales recomendaciones de práctica clínica enfatizan la necesidad de alcanzar los objetivos de HDL y TG una vez conseguido el objetivo terapéutico en LDL y minimizar así, el riesgo cardiovascular residual. El colesterol HDL se correlaciona de manera inversa con el riesgo cardiovascular ya que facilita su transporte desde los tejidos hasta el hígado. De hecho, Turner y colaboradores observaron que un aumento de 3,9 mg/dl en los niveles de colesterol HDL redujo un 15 % el número de episodios cardiovasculares.⁴¹

Cabe destacar que los principales estudios de prevención cardiovascular han demostrado que el tratamiento hipolipemiante comporta una favorable relación coste-beneficio reduciendo el riesgo entre el 25-55 %.⁴³ En la actualidad, las estatinas, fenofibratos o ezetimibe son los agentes hipolipemiantes más comúnmente prescritos junto a adecuadas pautas en la modificación del estilo de vida para alcanzar los objetivos terapéuticos.³⁷ Sin embargo, los anticuerpos monoclonales anti-PCSK9, evolocumab y alirocumab, representan un nuevo grupo de hipolipemiantes, destinados a conseguir reducciones significativas en el colesterol LDL, específicamente en pacientes de alto riesgo cardiovascular que no alcanzan el objetivo terapéutico propuesto a pesar de cambios en el estilo de vida, tratamiento máximo tolerado de estatinas en monoterapia o combinadas con ezetimibe, así como en aquellos que son intolerantes o tienen contraindicación para el uso de estatinas pero que igualmente tienen alto riesgo de eventos cardiovasculares. Con estos fármacos, empleados en monoterapia o en combinación con estatinas o ezetimibe, se ha observado una importante reducción del colesterol LDL que permite mantener las cifras en lo recomendado por las guías de práctica clínica.^{44,45} La evidencia clínica demuestra que los inhibidores PCSK9 son fármacos eficaces y seguros, que reducen los eventos cardiovasculares.^{44,46,47}

1.2. Mecanismos moleculares asociados a la T2D

1.2.1. Estrés oxidativo

1.2.1.1. Definición

El estrés oxidativo es el proceso de deterioro celular causado por una acumulación excesiva de radicales libres, principalmente especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), que excede la capacidad antioxidante de la célula produciendo una alteración persistente del equilibrio homeostático entre los sistemas oxidantes/antioxidantes a favor de los primeros.

1.2.1.2. Generación de ROS

En un contexto fisiológico, numerosas reacciones oxidativas de la célula, procesos físico-químicos o de biotransformación producen de forma natural y controlada las ROS. Entre las ROS más importantes cabe destacar el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$).

Aunque la mitocondria representa la mayor fuente de ROS generando $O_2^{\cdot-}$ en el interior de la membrana mitocondrial a través de la cadena de transporte electrónico, en la célula existen enzimas como la NADPH oxidasa (NOX) en la membrana plasmática o citoplasmáticas como la xantina oxidasa (XO) y la óxido nítrico sintetasa (NOS), entre otras, capaces de generar $O_2^{\cdot-}$. En presencia de la superóxido dismutasa (SOD), la adición de otro electrón produce el ión superóxido que se protona rápidamente generando H_2O_2 . El H_2O_2 , producto de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$, puede difundir a través de las membranas lipídicas y reaccionar con metales de transición reducidos como cobre (Cu^{2+}) o hierro (Fe^{2+}) dando lugar a especies más reactivas como el $\cdot OH$.⁴⁸

En principio, las ROS no deberían suponer un problema ya que, en condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de radicales libres y su neutralización por los sistemas antioxidantes, garantizando un ambiente homeostático. Sin embargo, cuando este equilibrio redox se altera y se produce una generación excesiva de moléculas prooxidantes junto a una reducción de las defensas antioxidantes, se inicia el daño celular.⁴⁹ En esta situación, las ROS actúan como agentes nocivos, extraordinariamente agresivos, siendo los lípidos de las membranas celulares y las lipoproteínas de la sangre especialmente susceptibles a la oxidación. Además, se producen fenómenos de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas, con pérdida de funcionalidad, y daño oxidativo del DNA, que puede generar alteraciones en la replicación y transcripción génica.⁵⁰ Las ROS además de afectar a diversas estructuras celulares debido a su

reactividad química, también inducen la transcripción de factores como el factor nuclear kappa B (NFκB, del inglés *Nuclear Factor Kappa β*) y el factor 1α inducible por hipoxia (HIF1α, del inglés *Hypoxia Inducible Factor 1α*), promoviendo la hipertrofia y proliferación celular.

1.2.1.3. Mitocondria como fuente de ROS

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático cuyas características estructurales y funcionales evidencian su peculiar origen según una de las teorías más aceptadas: una simbiosis perfecta entre dos organismos primitivos que supuso el nacimiento de la célula eucariota, uno de los pasos más importantes de la evolución. Este proceso clave comenzó cuando una bacteria fue fagocitada por un microorganismo de mayor tamaño con el fin de obtener energía en forma de ATP mientras la célula anfitriona proveía a su huésped de materia prima y protección; con el tiempo, la bacteria fagocitada fue asumiendo tareas cada vez más relevantes hasta convertirse en lo que hoy conocemos con el nombre de mitocondria.⁵¹

Las mitocondrias son los orgánulos intracelulares encargados de generar y suministrar la mayor parte de ATP a través del mecanismo de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *Oxidative Phosphorylation*). 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 CO₂, H₂O, NADH y FADH₂. Por otra parte, la β-oxidación de los ácidos grasos produce acetil-CoA (que puede entrar en el ciclo de Krebs), NADH y FADH₂. El proceso de OXPHOS consta de varias etapas y está mediado por la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte electrónico (ETC, por sus siglas en inglés *Electronic Transport Chain*) formada por cuatro complejos enzimáticos (I-IV) embebidos en la membrana mitocondrial interna (IMM, del inglés *Internal Mitochondrial Membrane*) más la ubiquinona y el citocromo C, y que son capaces de transferir los electrones procedentes de la oxidación del sustrato (NADH y FADH₂) hasta el O₂, que se reducirá formándose H₂O y generando un gradiente de protones.⁵² La transferencia de electrones se acopla con el transporte simultáneo de protones desde la matriz mitocondrial a través del IMM hacia el espacio intermembrana, generando así un gradiente de protones entre estos dos compartimentos, que es aprovechado por la ATP sintetasa (o complejo V) para catalizar la síntesis de ATP a partir de la fosforilación de ADP (Figura 4).

Si bien la mayoría de O₂ se consume completamente durante el proceso OXPHOS; una pequeña parte (1-2 %) se escapa desde los complejos I y III de la ETC⁵² y debido a una pequeña proporción de electrones que no atraviesa completamente la cadena respiratoria es convertido en O₂^{•-}, que puede llegar a ser altamente tóxico debido a que es una molécula muy reactiva. Las mitocondrias son la principal fuente de ROS y desempeñan un papel crucial en la homeostasis

redox, el metabolismo y múltiples funciones celulares cruciales como el ciclo de la urea, la termogénesis, la apoptosis y la muerte celular.⁵³⁻⁵⁸

1.2.1.4. Defensas antioxidantes

Para combatir los efectos deletéreos causados por el exceso de ROS existen eficientes mecanismos de defensa contra el daño oxidativo. Se trata de mecanismos que acontecen tanto a nivel fisiológico como molecular o bioquímico, de forma simultánea y sincronizada. Los mecanismos de defensa intentan prevenir la producción de ROS, detener o retrasar la reacción de oxidación en cadena que origina el radical, reparar los daños causados en las macromoléculas o degradar las lesionadas. Los mecanismos antioxidantes se pueden agrupar en sistemas antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos.

El sistema antioxidante enzimático incluye tres enzimas principales (Figura 4): la SOD, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). De hecho, constituyen la primera y mejor línea de defensa contra las ROS. Por su parte, la SOD cataliza la destrucción de $O_2^{\cdot-}$ formando H_2O_2 y destaca su papel en la protección de la vasculatura a través de sus tres formas moleculares:⁵⁹ SOD1, actúa en el citosol y precisa zinc y cobre; SOD2, actúa en la mitocondria y requiere manganeso, y la SOD3, localizada en el espacio extracelular y necesita cobre y zinc. Por otro lado, la CAT se localiza en los peroxisomas (o en el citosol de los glóbulos rojos), precisa hierro y neutraliza el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos, transformándolos en alcoholes inertes.⁶⁰ Por último, la GPX necesita glutatión reducido (GSH) como cofactor, el cual, en presencia de radicales libres, se oxida bajo el control de la enzima convirtiéndose en glutatión oxidado (GSSG) preservando el ambiente intracelular en un estado reducido. Es importante mencionar que la eficacia de este sistema defensivo reside en su triple acción conjunta reduciendo las especies oxigénicas y evitando que la combinación o acción de éstas generen especies más nocivas y agresivas tales como el $\cdot OH$.

El sistema antioxidante no enzimático incluye diversos tipos de moléculas cuya acción defensiva supone una interacción directa sobre la especie reactiva generando complejos estables o de menor reactividad. De este modo, en presencia de compuestos oxidables (como DNA, proteínas o lípidos), las defensas antioxidantes se oxidan antes que éstos para prevenir su oxidación, siendo las más importantes la vitamina E (α -tocoferol), el GSH, el ácido ascórbico, los flavonoides, el ácido úrico, la coenzima Q o ubiquinona y varios derivados de ésta, los carotenoides, etc.

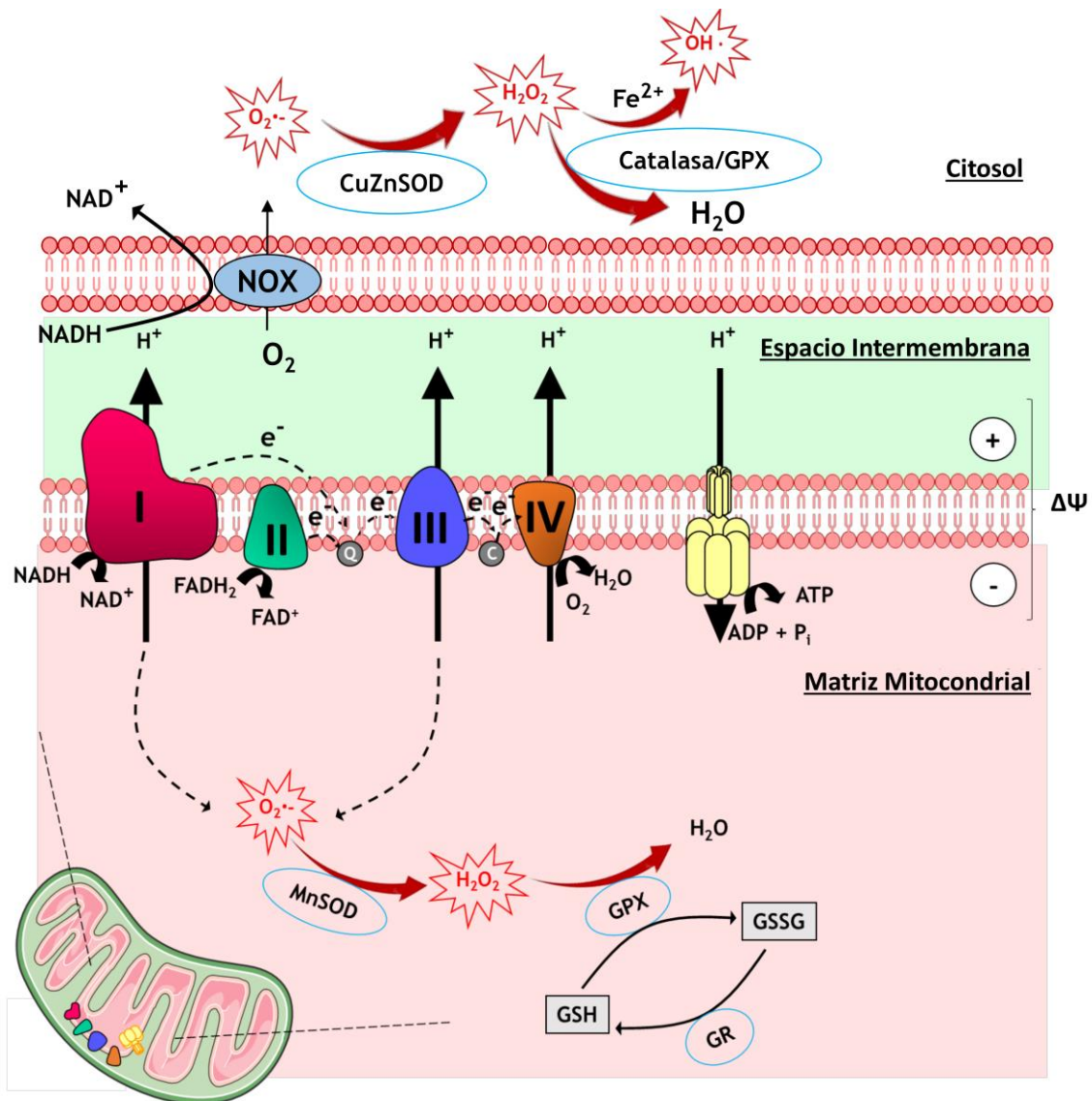


Figura 4. Producción y detoxificación de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra la ETC formada por los complejos I, II, III y IV, el coenzima Q (Q) y el citocromo C (C). La actividad de los complejos I, III y IV genera un gradiente electroquímico de protones (H^+) 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 ($O_2^{\cdot-}$). Esta molécula altamente reactiva es transformada en la matriz mitocondrial por la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es convertido en H_2O 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 el $O_2^{\cdot-}$ generado por la NADPH oxidasa (NOX) en H_2O_2 . EL H_2O_2 puede ser reducido a ión hidroxilo ($\cdot OH$) por iones de hierro (Fe^{2+}), o bien puede ser detoxificado a H_2O y O_2 por las enzimas catalasa (CAT) o GPX.

Sin ser antioxidantes como tal, al ser parte del sitio activo de las enzimas antioxidantes, el zinc, cobre, manganeso, hierro y otros minerales, juegan también un papel muy importante en la defensa mediada por enzimas. Además cabe destacar la respuesta citoprotectora contra agentes oxidantes del factor nuclear eritroide 2 (NRF2, del inglés *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*) que al ser liberado de su inhibidor, la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (KEAP1, del inglés *kelch-like ECH-associated protein 1*) y translocado al núcleo, es capaz de unirse a secuencias de “elementos de respuesta antioxidante” (ARE, del inglés *antioxidant response element*) y activar la transcripción de genes que codifican enzimas implicadas en respuestas antioxidantes y reacciones de detoxificación.⁶¹

Por último, además de los sistemas antioxidantes clásicos, nos gustaría destacar a las sirtuinas que son importantes sensores energéticos implicados en la regulación del metabolismo y la función mitocondrial.⁶² Cabe destacar la sirtuina 1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) que al desacetilar al coactivador 1 α del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), lo vuelve activo y promueve la biogénesis de mitocondrias. Se ha demostrado que los niveles de SIRT1 aumentan bajo situación de privación de nutrientes y ello promueve en última instancia que se active PGC-1 α que, para contrarrestar el efecto de la disminución de energía, aumenta el número de mitocondrias entre otros efectos.⁶³ Sin embargo, recientemente se ha descubierto que SIRT1 también puede promover el proceso contrario, eliminando por mitofagia aquellas mitocondrias dañadas o senescentes con una edad avanzada.⁶⁴

1.2.1.5. Papel del estrés oxidativo en la T2D

Hasta la fecha, la hipótesis más aceptada postula que en la T2D la mayor fuente de estrés oxidativo es la generación de O₂^{•-} a través de la ETC en la mitocondria y también contribuye de manera considerable la NADPH oxidasa en el citosol. En la patogénesis de la T2D existen diversos estímulos que promueven la inducción de estrés oxidativo, siendo la hiperglucemia el más relevante.⁶⁵ En este sentido, elevadas concentraciones de glucosa en sangre de forma crónica están asociadas con alteraciones lipídicas que pueden acabar afectando a la función de las células β , lo que conlleva asociado el concepto de “glucolipototoxicidad”. De hecho, el progresivo agotamiento de estas células determina la aparición de la hiperglucemia, inicialmente postprandial, y posteriormente de manera permanente. Con respecto a la hiperglucemia, algunos estudios indican que (1) el metabolismo mitocondrial tiene un papel clave en la formación de ROS, (2) en el metabolismo de la glucosa se induce la generación de ROS en diversos pasos y (3) la producción de ROS está estrechamente ligada a los cambios hemodinámicos ocurridos en respuesta a la hiperglucemia.⁶⁶

Estudios *in vitro* han demostrado que un aumento en las concentraciones de glucosa exógena conduce a un aumento proporcional en la peroxidación lipídica de eritrocitos humanos⁶⁷ y en la liberación de ROS sobre células endoteliales.⁶⁸ Con el fin de evaluar *in vivo* el efecto de la hiperglucemia sobre el estrés oxidativo, Marfella y colaboradores,⁶⁹ indujeron hiperglucemia aguda (270 mg/dl) en adultos jóvenes sanos durante 120 minutos, este hecho estuvo asociado a un aumento en la concentración plasmática de nitrotirosina (marcador de formación de peroxinitritos) y de citoquinas inflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y TNF α , así como un incremento del trabajo cardíaco y presión arterial. Estos efectos fueron prevenidos al administrar una infusión de glutatión sugiriendo un papel mediador de las ROS sobre la respuesta inflamatoria y las alteraciones hemodinámicas; reforzando la idea de que la hiperglucemia juega un papel importante en el aumento del estrés oxidativo.

En este sentido, se ha descrito que el proceso por el cuál la glucosa promueve un estado de estrés oxidativo se genera principalmente en la mitocondria y se inicia con el aumento de la glucólisis bajo condiciones de hiperglucemia, produciendo más moléculas de NADH en el complejo I mitocondrial, mayor flujo de electrones y, por tanto, mayor generación de O₂^{•-}. Es de destacar que la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es inhibida como consecuencia del aumento en los niveles de ROS y,⁷⁰ por tanto, la glucosa y sus metabolitos como la fructosa-1,6-bifosfato y el gliceraldehído-3-fosfato son desviadas a vías metabólicas alternativas. Hasta la fecha, se han descrito al menos cuatro rutas metabólicas asociadas con el daño celular mediado por la hiperglucemia (Figura 5) y representan las principales formas de metabolismo de los intermediarios glucolíticos acumulados.⁷¹

En la vía del polialcohol, la enzima aldosa reductasa reduce la glucosa a sorbitol a expensas de consumir NADPH. La activación de esta vía bajo elevados niveles de glucosa conlleva una disminución en los niveles de NADPH lo cual limita la acción de las enzimas antioxidantes, CAT, GPX y NOS, las cuales también lo emplean como cofactor. La consecuencia deletérea sería una reducción de la capacidad antioxidante de la célula,⁷² por tanto, un incremento del estrés oxidativo, y en el caso de la NOS una reducción en la síntesis de óxido nítrico (NO), el vasodilatador natural más importante del organismo.^{73,74}

En la vía de la hexosamina, la fructosa-6-fosfato se convierte en glucosamina-6-fosfato que puede servir como sustrato a la enzima glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT, del inglés *fructose-6-phosphate amidotransferase*) cuyo producto puede ser posteriormente convertido a uridina difosfato N-acetilglucosamina (UPD-GLcNAc), sustrato de una enzima capaz

de transferirlo a los residuos serina/treonina de otras proteínas (como la NOS endotelial, eNOS) y factores de transcripción (como Sp1), modificándolos postranscripcionalmente y dando lugar a cambios en la expresión de algunos genes (como AP-1). La activación de esta ruta también genera ROS y, ^{75,76} por tanto, está implicada en el desarrollo de las múltiples complicaciones que acompañan a la T2D. ^{77,78}

La activación de la vía proteína quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*) se produce por un aumento en la síntesis de diacilglicerol y conlleva múltiples alteraciones en la regulación del flujo sanguíneo, ^{79,80} permeabilidad vascular y neovascularización. ⁸¹ La PKC potencia el desacoplamiento de la eNOS y activa la NADPH oxidasa lo que conlleva una mayor acumulación de ROS. ^{68,82} Bajo condiciones de hiperglucemia la activación de la PKC en el endotelio reduce la biodisponibilidad de NO, produciendo defectos en la vasodilatación y disfunción endotelial. ⁸³ Por último, es de destacar que entre las funciones de la PKC se encuentra la de activar NFκB, promoviendo así la expresión de genes proinflamatorios. ⁸⁴

La cuarta ruta alternativa consiste en la generación de productos avanzados de glucosilación (AGE, del inglés *advanced glycation end products*) al reaccionar el metabolito metilglioxal (derivado del gliceraldehído-3-fosfato) con los grupos amino de ciertas proteínas. ⁸⁵ Además de la producción endógena de AGE, éstos pueden ser adquiridos exógenamente a través de los alimentos ⁸⁶. Al unirse a su receptor (RAGE) inducen la generación intracelular de ROS, tanto en el citosol como en la mitocondria, ^{72,87,88} que activan varias citoquinas y factores de crecimiento ^{89,90}. Numerosos estudios han relacionado el incremento de AGE con disfunción mitocondrial y defectos en la secreción de insulina, ⁹¹ nefropatía ⁹² o enfermedad cardiovascular. ⁹³

En la patogénesis de la T2D y sus complicaciones además de la hiperglucemia, una elevada concentración de FFA favorece la generación de ROS principalmente a través de la NADPH oxidasa ⁸² facilitando la oxidación de LDL pequeñas y densas en los vasos sanguíneos y como consecuencia el desarrollo de aterosclerosis. ⁹⁴

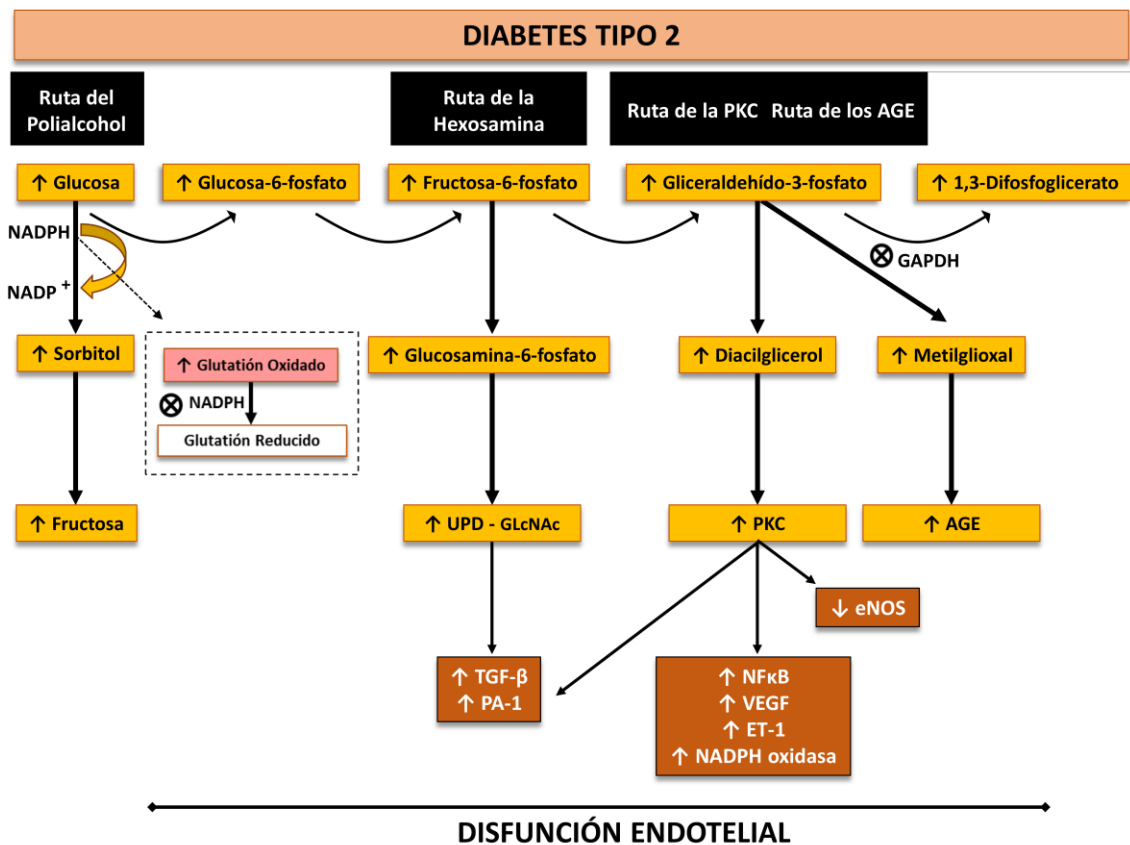


Figura 5. Vías de señalización por las que el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia induce daño vascular en la diabetes tipo 2: Ruta del polialcohol, ruta de la hexosamina, activación de la ruta de la PKC y ruta de AGE. La sobreproducción mitocondrial de ROS activa estas cuatro vías principales de metabolismo de la glucosa bajo condición de hiperglucemia al inhibir la GAPDH, que finalmente provocan la disfunción endotelial. GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; GLcNAc, β -N-acetilglucosamina; TGF- β , factor de crecimiento transformador- β ; PA-1, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; PKC, proteína quinasa C; NF κ B, factor nuclear kappa B; ET-1, endotelina 1; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; eNOS, óxido nítrico sintetasa endotelial; AGE, productos avanzados de glicosilación.

1.2.1.6. Disfunción mitocondrial

Se define disfunción mitocondrial como una alteración debida a factores genéticos o ambientales en el número, densidad o función de las mitocondrias en una célula/tejido. Las mitocondrias constituyen la principal fuente de ROS a través de la ETC durante la respiración celular y debido a la continua exposición que sufren, son particularmente vulnerables al daño oxidativo.⁹⁵

Una de las principales consecuencias de la producción mitocondrial excesiva de ROS es la peroxidación lipídica, en concreto el daño sobre la cardiolipina, un fosfolípido de la IMM cuya

oxidación conduce a una reducción del $\Delta\Psi_m$ y a la alteración de la permeabilidad celular. Estas ROS mitocondriales también producen daño en el DNA mitocondrial y en las proteínas involucradas en la ETC, disminuyendo su afinidad por coenzimas o sustratos,⁹⁶ limitando la síntesis de ATP y comprometiendo así la función mitocondrial.⁹⁷ Es importante destacar que el daño oxidativo sobre las proteínas mitocondriales que intervienen en el funcionamiento del complejo I tiene relevantes consecuencias sobre la función mitocondrial puesto que la IMM contiene menor cantidad de éste que del resto de complejos que conforman la ETC.^{98,99} Todas estas alteraciones debidas al estrés oxidativo, desencadenan de nuevo una mayor liberación de ROS lo que genera un círculo vicioso que puede activar cascadas de señalización y conducir finalmente a la muerte celular por apoptosis o necrosis.¹⁰⁰ La disfunción mitocondrial puede provocar, por tanto, daño en órganos y tejidos promoviendo el desarrollo de enfermedades entre las que se incluyen el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y obesidad.¹⁰¹

El estudio de tejidos con elevado consumo de O_2 , donde la alteración de las mitocondrias pueda tener importantes consecuencias fisiológicas, es de especial interés dado que la disfunción mitocondrial se caracteriza entre otros por una inhibición en el consumo de O_2 . A nivel muscular, se ha descrito una disminución del consumo de O_2 junto a una reducida actividad de la enzima citrato sintasa (metabolismo oxidativo) en sujetos diabéticos.^{102,103} De otra manera, se ha descrito una respiración mitocondrial aumentada en el músculo esquelético y reducida en el hígado de ratones diabéticos (db/db) indicando una regulación tejido-específica en la función mitocondrial.¹⁰⁴

Dado que las mitocondrias son las principales responsables del metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, parece lógico pensar en la existencia de una relación directa entre la disfunción mitocondrial y la IR, hecho que ha sido descrito tanto en humanos como en modelos animales.¹⁰⁵ En este sentido, se ha demostrado que el ejercicio aeróbico aumenta la respiración mitocondrial muscular, disminuye la generación de ROS y modula la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos.¹⁰⁶

1.2.2. Estrés de retículo endoplasmático

1.2.2.1. Retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (ER, del inglés *endoplasmic reticulum*) es una red de membranas dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos que están interconectados entre sí compartiendo el mismo espacio interno (lumen). Este orgánulo es responsable de la síntesis, modificación, plegamiento y exportación de proteínas. Además, tiene un papel clave en la síntesis de lípidos de la membrana plasmática, hormonas esteroideas y ácidos biliares y constituye un reservorio intracelular de calcio.

1.2.2.2. Respuesta al mal plegamiento proteico

Generalmente el ER necesita un ambiente oxidativo, elevadas concentraciones de calcio y chaperonas para poder cumplir con sus funciones. Las chaperonas juegan un papel esencial en el plegamiento y maduración de las proteínas recién sintetizadas, también se encargan de detectar errores e identificar las proteínas defectuosas para su degradación. Sin embargo, en condiciones patológicas pueden darse circunstancias por las que se pierdan estas condiciones y comience a producirse la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen. Esta situación es conocida como estrés de ER y puede desencadenar la cascada de señalización ER-núcleo activando la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*) para reestablecer la homeostasis del ER.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ La UPR es una respuesta adaptativa y citoprotectora que inicialmente actúa (1) promoviendo la expansión del ER y la expresión de chaperonas para aumentar la capacidad de plegamiento (2) atenuando la síntesis de proteínas para limitar la carga del ER y (3) activando el sistema de degradación de proteínas mal plegadas asociado al ER (ERAD, del inglés *endoplasmic reticulum-associated protein degradation*).¹¹⁰ Si bajo una gran acumulación de proteínas mal plegadas estos mecanismos no resuelven el ER recuperando el funcionamiento normal de la célula, finalmente la UPR elimina la célula dañada por activación de las cascadas proapoptóticas.¹¹¹

Las rutas de señalización que controlan la UPR están encabezadas por tres proteínas transmembrana (Figura 6): la quinasa del ER tipo PKR (PERK, del inglés *double-stranded RNA-activated protein kinase-like kinase*), la proteína 1 que requiere inositol (IRE1, del inglés *inositol requiring enzyme 1*), y el factor de transcripción activador 6 (ATF6, del inglés *activating transcription factor 6*). Estos receptores transmembrana específicos se mantienen en estado inactivo mientras están unidos por su extremo N-terminal a la proteína regulada por glucosa de 78 KDa (GRP78, del inglés *78-kDa glucose-regulated protein*), sin embargo, una sobrecarga en el ER de proteínas mal plegadas requiere la función plegadora de esta chaperona y por

consiguiente GRP78 se disocia de los receptores.¹¹² En los pasos iniciales de la UPR, la activación de PERK inhibe la traducción de proteínas a través de la fosforilación del factor iniciador de la traducción eucariota 2 α (eIF2 α , del inglés *eukaryotic translation initiation factor 2 α*) y se promueve la expresión de genes antioxidantes por activación del factor de transcripción activador 4 (ATF4, del inglés *activating transcription factor 4*), mientras que cuando el estrés de ER es crónico se induce la cascada proapoptótica por activación de la proteína homóloga de C/EBP de unión al CCAAT (CHOP, del inglés *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*). Por otra parte, en este primer mecanismo de adaptación, la activación de IRE1 procesa el splicing de ARN mensajero de la proteína 1 de unión a X-box (XBP1, del inglés *X box protein-1*) para generar su forma transcripcionalmente activa sXBP1, la cual se unirá a promotores que modulan la transcripción de componentes de la respuesta ERAD y la producción de chaperonas. Por último, la activación de ATF6 promueve su traslocación al aparato de Golgi, donde sufre una proteólisis regulada, se trasloca al núcleo y al igual que ocurre en la ruta IRE1/XBP1 se promueve la transcripción de genes diana de la UPR.¹¹³

Para preservar la supervivencia celular, bajo determinadas circunstancias el estrés de ER es capaz de inducir autofagia.¹¹⁴ Los tres factores de transcripción (ATF4, sXBP1 y ATF6) implicados en las tres vías del mecanismo de adaptación de la UPR no son independientes, sino que promueven la expresión de moléculas implicadas en la inmunidad innata y una excesiva activación de ésta puede dar lugar a la expresión de genes proapoptóticos.^{111,115,116}

Entre las respuestas adaptativas a UPR más relevantes, ATF4 y NRF2 inducen la expresión de una serie de elementos de respuesta antioxidante para contrarrestar ER y el exceso de ROS celular. Además, la vía ERAD y la maquinaria autofágica son promovidas por sXBP1 y ATF6, y el eje IRE1 α con activación de la quinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*), respectivamente, para facilitar el aclaramiento de proteínas.¹¹⁷

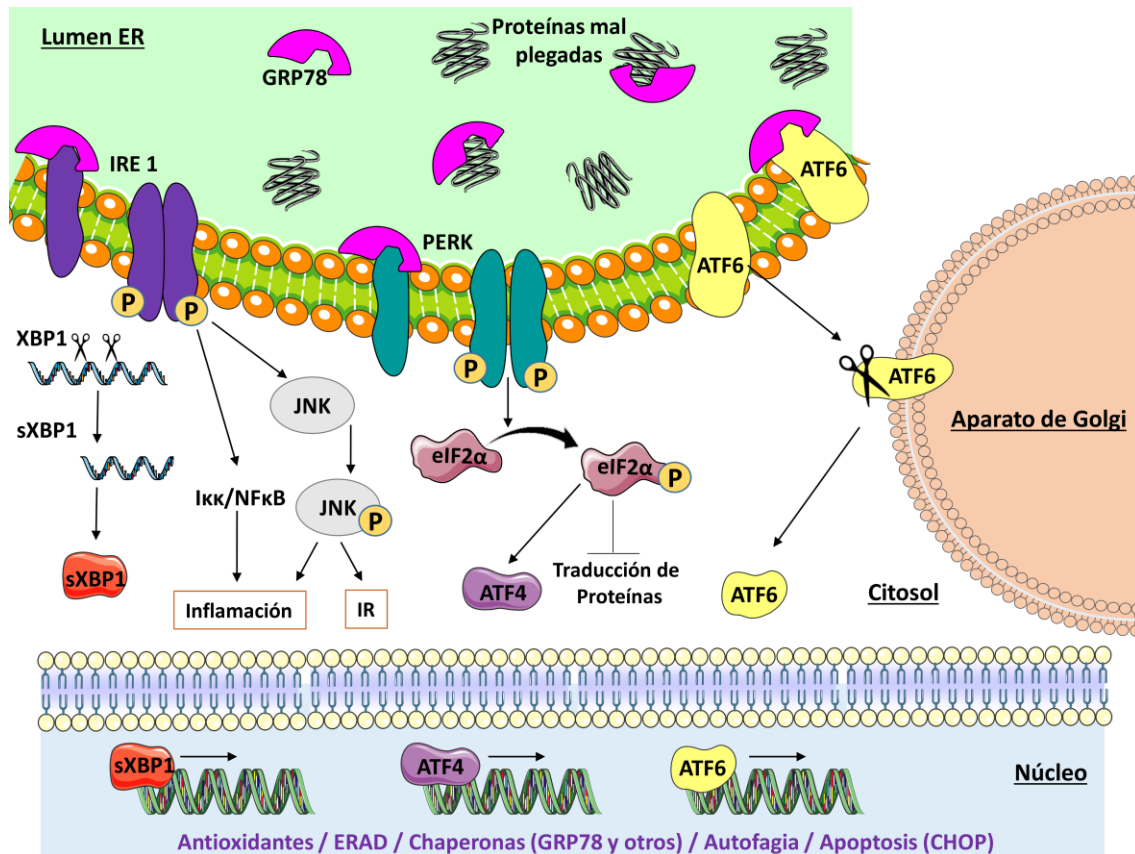


Figura 6. Respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR). Cuando hay una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (ER), la proteína de 78kDa regulada por glucosa (GRP78) se une a ellas para ejercer su acción como chaperona, dejando libres a las tres proteínas de membrana a las que regula negativamente y que inician la UPR. Los tres sensores de estrés de ER detectan el aumento de proteínas mal plegadas e inician la respuesta con objeto de resolver esta situación. La proteína 1 que requiere inositol (IRE1) pasa a formar dímeros y promueve el splicing del ARNm de la proteína 1 de unión a X-box (*XBP1*) dando origen a la forma transcripcionalmente activa de *XBP1* (*sXBP1*) que se dirige al núcleo. En la segunda vía, la quinasa del ER tipo PKR (PERK) también dimeriza y fosforila al factor iniciador de la traducción eucariota 2α (*eIF2α*) inhibiendo, por un lado, la traducción proteica para aliviar la carga de plegamiento del ER e, induciendo por otro, la expresión y activación del factor de transcripción activador 4 (ATF4) que se trasloca al núcleo. Por último, el factor de transcripción activador 6 (ATF6) es procesado para su activación proteolítica en el aparato de Golgi, y su versión corta pasa al núcleo. Cuando los factores de transcripción *sXBP1*, ATF4 y ATF6c entran en el núcleo, promueven respuestas antioxidantes, la expresión de genes relacionados con el plegamiento proteico, el sistema de degradación de proteínas asociado al ER (ERAD), el proceso de autofagia y la apoptosis celular. CHOP, proteína homóloga de C/EBP de unión al enhancer CCAAT.

1.2.2.3. Papel de estrés de ER en la T2D

La alteración de la homeostasis del ER puede dar lugar a estrés del ER y activar la UPR relacionada con diferentes procesos implicados en el desarrollo de la IR y la T2D como la inflamación, la acumulación de lípidos, la biosíntesis de insulina y la apoptosis de las células β .^{118,119}

Fue en un estudio realizado en ratones obesos donde por primera vez Ozcan y colaboradores evidenciaron que el estrés de ER contribuye al desarrollo de IR en tejidos diana. En este estudio se determinó una activación más pronunciada de la UPR en tejido adiposo y hepático. De hecho, establecieron que este aumento en el estrés de ER activa la JNK que a su vez fosforila al IRS, inhibiendo la cascada de señalización de la insulina.¹²⁰ En la misma línea, posteriormente se ha demostrado que también en adipocitos de pacientes obesos existe una activación de la ruta de señalización IRE/XBP1 y de la vía JNK^{121,122} y que el estrés de ER es un mecanismo derivado de la obesidad ya que el ejercicio físico en ratas obesas¹²³ o la pérdida de peso en la población obesa¹²⁴ reduce la expresión de marcadores de estrés de ER en tejido adiposo e hígado y mejora la IR. En el contexto de la obesidad, según el tipo celular, el ER se enfrenta a diferentes desafíos metabólicos, viéndose particularmente afectadas las células secretoras: adipocitos, hepatocitos y células β , debido a la mayor demanda de síntesis de proteínas.¹¹³ En los adipocitos, la hipertrofia y el aumento de la síntesis de adipocinas pueden representar una situación estresante para el ER. En el hígado, el metabolismo lipídico alterado, el incremento de gluconeogénesis y la síntesis de proteínas pueden desencadenar estrés de ER.¹²⁵ Una alta demanda de insulina en respuesta al desarrollo de IR puede hacer que el ER se vea abrumado en las células β . Sin embargo, una mayor síntesis de proteínas no puede explicar totalmente el estrés de ER inducido por la obesidad y a pesar de que la regulación en sentido ascendente de la UPR en la obesidad no se comprende completamente, estudios *in vitro*, datos experimentales en animales y estudios en humanos han demostrado el papel de los FFA, las citoquinas inflamatorias, la producción de ROS y la glucosa en el desarrollo del estrés de ER.¹²⁶ La insulina también parece activar la UPR, ya que la hiperinsulinemia inducida incrementa la expresión de GRP78, ATF4, ATF6 y XBP1 en el tejido adiposo de los humanos normoglucémicos.¹²⁷ Dicho esto, es poco probable que la insulina sea el principal estímulo del estrés de ER en individuos con T2D, dado que los tejidos diana de la insulina son incapaces de responder a esta hormona en dicho contexto. Los mediadores descritos anteriormente parecen provocar alteraciones significativas en las condiciones del lumen del ER, incluido el agotamiento de Ca^{2+} y el desequilibrio redox, e interfieren gravemente con la capacidad y funcionalidad de plegado de

ER.¹²⁸ Las deficiencias en la función del proteasoma y la autofagia en la obesidad también pueden acentuar el estrés del ER debido a la incapacidad de procesar proteínas y orgánulos no deseados, y pueden contribuir al IR.^{129,130} No obstante, aunque el mecanismo exacto continúa por elucidarse, estudios en ratones han señalado que la disfunción del proteasoma sería la causa principal por la cual en la obesidad se induce una activación de la UPR,¹²⁹ de hecho, se ha observado en adipocitos humanos que el bloqueo en la función del proteasoma junto al estrés oxidativo que acompaña a la obesidad, acentúa el estrés de ER.¹³¹ Sin embargo, todavía existen lagunas importantes en el conocimiento de cómo la UPR está regulada y su naturaleza altamente dinámica sugiere que esto puede ocurrir de manera diferente según el tipo de tejido.

A raíz de estos estudios que han establecido un nexo de unión entre el estrés de ER, la obesidad, la inhibición de la acción de la insulina y el desarrollo de T2D, son numerosos los trabajos que han intentado profundizar en el papel de estrés de ER en la fisiopatología de la T2D. En relación con la principal alteración de la T2D, ATF4 parece desarrollar una función esencial en el metabolismo de los carbohidratos y por tanto en el equilibrio energético. Bajo estrés de ER se han determinado elevados niveles de expresión de esta proteína en tejidos metabólicos de mamíferos y moscas, que podrían interferir en su mecanismo de control.¹³² Por otro lado, en tejido hepático bajo estrés de ER, la activación de la UPR podría estar participando en el desarrollo de la IR al promover la gluconeogénesis y la lipogénesis.^{133,134} En el contexto de la T2D es de especial interés conocer el papel del estrés de ER sobre la disfunción y destrucción de las células β pancreáticas en esta enfermedad,¹³⁵ ya que durante la respuesta compensatoria de las células β el aumento en la síntesis de proinsulina (sintetizada y plegada en el ER) puede comprometer la capacidad de plegamiento del ER. La acumulación de proinsulina mal plegada puede promover una activación prolongada de la vía PERK/eIF2 α y la muerte de las células β .^{135,136} Por tanto, la acción secretatoga de estas células, las convierte en particularmente vulnerables al estrés de ER.

Además, no sólo el tejido adiposo y hepático presentan una actividad pronunciada de la UPR, ya que en nuestro grupo de investigación se ha constatado un incremento del estrés de ER sobre leucocitos de sangre periférica en pacientes obesos con T2D respecto a sujetos con obesidad sin patología¹³⁷ y en pacientes con T2D respecto sujetos sanos, en los cuales se ha demostrado que, en función del grado de control glucémico, existe una expresión diferencial de los marcadores de ER.¹³⁸ En cuanto al músculo esquelético, se ha demostrado que para la activación de la UPR se requiere la activación del regulador negativo de la ruta de la insulina, la

proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B, del inglés *protein tyrosine phosphatase 1B*), localizado en la membrana del ER.¹³⁹

1.2.2.4. Relación entre estrés oxidativo, estrés de ER e inflamación

Una excesiva acumulación de ROS o alteración del equilibrio redox, altera el ambiente oxidante del ER necesario para que las enzimas encargadas del correcto plegamiento de las proteínas formen los puentes disulfuro, alterando su capacidad plegadora y dando lugar, por tanto, al estrés de ER.¹⁴⁰ A su vez, la propia activación de la UPR a través de las chaperonas, inicia la transferencia de electrones desde los grupos tiol de las proteínas que se están plegando hasta el O₂ y desencadena la generación de ROS como subproducto.¹¹⁵ Si esta situación se puede sostener es gracias al mecanismo de respuesta antioxidante de la UPR a través de la vía PERK que estimula la transcripción de múltiples genes antioxidantes por activación de NRF2.¹⁴¹

Por otra parte no sólo existe una relación entre el estrés oxidativo y el estrés de ER, que además teniendo en cuenta lo anteriormente descrito no se trata de una relación unidireccional, sino que las tres vías de la UPR convergen con la señalización inflamatoria a través de la posible activación de NFκB.¹¹³ Además, la UPR a través de la activación de IRE1 y/o PERK promueve un aumento en los niveles de la proteína que interactúa con la tiorredoxina (TXNIP, del inglés *thioredoxin-interacting protein*), la cual activa el inflammasoma NLRP3 (en inglés *NLR family pyrin domain containing 3*) impulsando la liberación de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1β (IL-1β).¹⁴² No sólo esta vía estimula la señalización inflamatoria, sino que IRE1 por unión al factor 2 asociado al receptor de TNFα (TRAF2, del inglés *TNF receptor-associated factor 2*) también es capaz de activar JNK.¹⁴³ La activación de estas vías a través de la UPR continúa con la cascada inflamatoria, estableciéndose un enlace directo entre estrés de ER e inflamación.¹⁴⁴ En tejido adiposo de ratones obesos se ha descrito una activación crónica de la inflamación como consecuencia del estrés de ER y se postula que la liberación de citoquinas desde el tejido adiposo a la circulación puede estar contribuyendo al desarrollo de IR.¹²²

1.3. Procesos subyacentes asociados al riesgo cardiovascular en la T2D

La evolución de la T2D viene caracterizada por una serie de complicaciones, algunas se manifiestan clínicamente y otras aparecen a más largo plazo, pero que en cualquier caso competen directamente en los aspectos de prevención primaria. Conocer los factores de riesgo y los procesos fisiológicos que se esconden detrás de dichas comorbilidades aumentando el riesgo cardiovascular asociado a la T2D, es esencial para frenar sus consecuencias sobre la salud.

1.3.1. Inflamación

La inflamación es una respuesta compleja del organismo que implica una sucesión de eventos en los que participan los sistemas nervioso, inmunológico y vascular coordinados y dirigidos a controlar o reparar el daño ante la exposición a agentes infecciosos, lesiones físicas o estímulos antigénicos.

El desequilibrio metabólico que caracteriza a la T2D se ha relacionado con un estado de inflamación crónica y de bajo grado y, de hecho, se ha llegado a clasificar la T2D como una enfermedad inflamatoria.¹⁴⁵ En este sentido, se ha señalado una relación fisiopatológica con esta respuesta inflamatoria por dos mecanismos, (i) uno vinculado con la obesidad y la actividad endocrina del tejido adiposo y (ii) otro que implica el desarrollo de la respuesta inmune debido a la generación de AGE por glucosilación no enzimática de proteínas.

Está bien establecido que una vez los adipocitos alcanzan su límite de expansión (hipertrofia), los FFA se depositan en forma de triglicéridos en tejidos periféricos como el músculo y el hígado, causando lipotoxicidad que dificulta el metabolismo intrahepático de la insulina causando hiperinsulinemia e IR.¹⁴⁶ Por otra parte, en el contexto diabético bajo estrés oxidativo se activan rutas alternativas como la generación de AGE los cuales se ha descrito que se unen a receptores específicos en la superficie celular de macrófagos, monocitos y células endoteliales favoreciendo su activación, reclutamiento o infiltración.^{147,148} En cualquier caso este escenario induce, fundamentalmente en adipocitos, hepatocitos y leucocitos activados,¹⁴⁹ la liberación excesiva a la circulación de citoquinas proinflamatorias como TNF α o IL-6, que induce la expresión hepática de la proteína C reactiva (CRP, del inglés *C-reactive protein*), un marcador fundamental de la respuesta de fase aguda.¹⁵⁰⁻¹⁵²

Las citoquinas, al igual que el exceso de ácidos grasos saturados, son claves en el desarrollo de IR^{153,154} ya que activan las rutas de señalización JNK, PKC o el inhibidor de la subunidad β de la quinasa de NF κ B (I κ k β , del inglés *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit β*),⁸ que bien

mediante la fosforilación de los residuos serina de los IRS o bien por reducción de la expresión del receptor de glucosa dependiente de insulina, GLUT4,¹⁵⁵⁻¹⁵⁹ conllevan la inhibición de la cascada de señalización de la insulina lo que disminuye su afinidad por el receptor de insulina.^{160,161} Por otro lado, la fosforilación de I κ B β conlleva la liberación de NF κ B, que se transloca al núcleo donde induce la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión¹⁶² y de numerosos genes diana cuyos productos inducen IR.^{163,164} Además de mitigar la transducción de la señal a través de la ruta de la insulina, bajo condiciones de hiperglucemia la respuesta inflamatoria sistémica libera elevadas concentraciones de IL-1 β , la cual induce apoptosis por la activación receptor/ligando de la ruta de muerte celular inducida (Fas/FasL) causando disfunción de las células β .¹⁶⁵

Estudios clásicos han descrito la correlación existente entre los niveles de TNF α , IL-6, CRP y la IR.^{151,166,167} Además, existen considerables evidencias científicas que respaldan que en obesidad y T2D, la activación de las rutas de NF κ B y JNK es clave en la señalización proinflamatoria y sus mecanismos moleculares asociados.¹⁴⁵ Por ejemplo, en un modelo murino de obesidad, el tratamiento con salicilatos que inactivan la señalización del complejo proteico NF κ B es capaz de revertir la IR¹⁶⁸. También se ha observado que la activación de la vía NF κ B en el hígado por dietas ricas en grasa y obesidad, produce un incremento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL-6 e IL-1 β que afectan directamente a la IR tanto a nivel local como sistémico.¹⁶³ Pero además en sentido inverso, un estudio sobre pacientes obesos no diabéticos concluyó que la infusión de una dosis baja de insulina (2-2,5 UI/h) reduce la producción de ROS, aumenta la expresión proteica de I κ B β y reduce la expresión intranuclear de NF κ B en monocitos, disminuyendo además la concentración plasmática de moléculas de adhesión.¹⁶⁹

La liberación de citoquinas proinflamatorias a la circulación está asociada con el riesgo de desarrollar complicaciones micro- y macrovasculares,¹⁷⁰ así como a un aumento de la mortalidad debida principalmente a problemas cardiovasculares,¹⁷⁰⁻¹⁷² ya que se promueve la atracción de los leucocitos hacia las paredes vasculares favoreciendo la formación de placas ateroscleróticas.¹⁷³ De forma particular, los niveles de CRP liberados en el hígado en respuesta a la inflamación sistémica constituyen un importante parámetro de predicción de posibles eventos cardiovasculares,¹⁷⁴ mientras que en enfermedad coronaria se ha descrito un papel clave de la IL-6 circulante, ya que estimula el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, cuya activación está asociada con la obesidad central, la HBP y la IR.¹⁷⁵ Otra evidencia que pone de manifiesto la importancia de la inflamación en el desarrollo de complicaciones asociadas a la

T2D es la relación establecida en la patogénesis de nefropatía diabética entre el aumento de IL-6 y CRP, y un engrosamiento de la membrana basal glomerular.¹⁷⁶ Estos marcadores junto a TNF α y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1, del inglés *vascular cell adhesion molecule-1*) e intercelular (ICAM-1, del inglés *intercellular adhesion molecule-1*) son empleados para evaluar el pronóstico y progresión de la T2D.¹⁷⁷

1.3.2. Disfunción endotelial

El endotelio es el tejido que recubre la capa interna de la pared de los vasos sanguíneos, y constituye en realidad un complejo órgano endocrino, autocrino y paracrino que regula la mayoría de las funciones de todos los lechos arteriales. Los receptores que cubren la superficie de las células endoteliales permiten la secreción y liberación de diversas sustancias vasoactivas que regulan el tono vascular, flujo y presión sanguínea; sustancias que participan en la fibrinólisis, reacciones inflamatorias e inmunológicas, procesos de coagulación regulando la trombogénesis; ROS y RNS, involucradas en la oxidación y nitrosilación de proteínas, lípidos y factores de crecimiento que inducen el crecimiento celular. El endotelio tiene un papel crucial en la homeostasis vascular que implica un equilibrio entre un estado vasoconstrictor –con propiedades proinflamatorias, prooxidantes y protrombóticas– y un estado vasodilatador –frecuentemente antiinflamatorio, antioxidante y antitrombótico–.

La principal función del endotelio es regular el flujo y perfusión tisular a través de cambios en el diámetro y tono vascular. El endotelio controla el tono vascular mediante la producción de sustancias con capacidad vasoconstrictora (como la endotelina 1 y la angiotensina II) y vasodilatadora (como el NO y la prostaciclina). El papel del endotelio como secretor de NO a través de la eNOS es crucial ya que el NO no sólo es un potente vasodilatador que mantiene la homeostasis vascular, sino que, además, es capaz de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión leucocitarias.¹⁷⁸

Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en la liberación de los factores vasodilatadores y vasoconstrictores o una disminución en la biodisponibilidad de NO, se altera la funcionalidad del endotelio, proceso conocido como disfunción endotelial¹⁷⁹ que predispone al estrés oxidativo, inflamación, vasoconstricción, activación plaquetaria, infiltración leucocitaria, proliferación celular en las paredes vasculares, alteración de la coagulación y, finalmente, aterosclerosis y trombosis.¹⁸⁰⁻¹⁸²

Como bien se ha descrito anteriormente, bajo condiciones de hiperglucemia, IR e inflamación que son características en la patogénesis de la T2D se promueve una generación excesiva de

ROS. La reacción del NO con las ROS dan lugar a la formación de peroxinitrito, promoviendo a su vez más estrés oxidativo que induce finalmente el desacoplamiento de la eNOS.¹⁸² El desequilibrio generado entre la acumulación de ROS y la reducida biodisponibilidad de NO conlleva la disfunción endotelial y el daño vascular asociado.^{183,184}

1.3.3. Interacción leucocito-endotelio

Los leucocitos son células inmunitarias que participan activamente en la respuesta inflamatoria propia de la T2D.¹⁸⁵ Se trata de células con alto metabolismo glucídico y alta permeabilidad a la glucosa que no requieren insulina para su captación, por lo tanto, el incremento de los niveles de glucosa intracelular desencadena toda una serie de fenómenos fisiopatológicos (mayor producción de ROS, reducción en la síntesis de prostaciclina y NO, glicación de proteínas) que inducen la señalización inflamatoria promoviendo la disfunción endotelial.¹⁸⁶ En este sentido, estudios clásicos han señalado que una activación crónica del sistema inmunitario puede ser un factor clave en el desarrollo de la IR a través de la activación de mecanismos inflamatorios.^{187,188} Por ejemplo, Sourris y colaboradores han observado una correlación negativa de la actividad NFκB en células de sangre periférica y la sensibilidad a la insulina.⁸⁷

Como consecuencia del estado inflamatorio crónico asociado a la T2D (Figura 7), existen niveles elevados de leucocitos activados circulando por el torrente sanguíneo. Estas células no sólo pueden promover el desarrollo de IR, sino que se aproximan y ruedan sobre las paredes endoteliales y finalmente son reclutadas por éstas iniciándose su transmigración endotelial. En respuesta a un estímulo inflamatorio, las células endoteliales inician la secreción de quimiocinas y citoquinas cuyos receptores se encuentran en la superficie de los leucocitos y facilitan su aproximación a las paredes vasculares.¹⁸⁹ Estas citoquinas además inducen la activación de factores de transcripción que aumentan la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial atrayendo a los leucocitos circulantes. En concreto, la L-selectina (expresada en la superficie de los leucocitos) y la E-selectina (en las células endoteliales activadas) son las proteínas de adhesión encargadas del primer contacto establecido entre los leucocitos y el endotelio activado.¹⁹⁰ Tras la atracción y captura de los leucocitos, comienza la fase de rodamiento sobre el endotelio controlada principalmente por la P-selectina expresada en las células endoteliales, los leucocitos van disminuyendo así su velocidad hasta que se adhieren firmemente al producirse la interacción entre las integrinas (localizadas en la membrana de los leucocitos) y sus receptores ICAM y VCAM en las células endoteliales.^{190,191} Una vez se ha producido la adhesión firme al endotelio, mediante la acción de la molécula de adhesión

plaqueta-endotelial (PECAM-1, del inglés *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) e ICAM-1 entre otras, comienza el proceso de extravasación o diapédesis por el cual los leucocitos migran a través de los espacios intercelulares atravesando el endotelio hasta alcanzar el foco de infección.¹⁹²⁻¹⁹⁴

Las moléculas de adhesión se pueden encontrar libres en suero y plasma ya que pueden sufrir una escisión proteolítica y ser liberadas a la circulación como formas solubles.^{195 224} Además, las interacciones de los leucocitos con el endotelio vascular pueden ser evaluadas bien mediante técnicas de imagen *in vivo*¹⁹⁶ o bien mediante cámaras de flujo paralelo *ex vivo* por perfusión de una suspensión aislada de leucocitos sobre una monocapa de células endoteliales.¹⁹⁷

El estudio de este proceso de reclutamiento de los leucocitos hacia las paredes vasculares en pacientes con T2D, permite determinar la predisposición al desarrollo de posibles complicaciones vasculares¹⁹⁸ y facilita el diseño de nuevas estrategias para su prevención. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los pacientes diabéticos están en mayor riesgo del desarrollo temprano de aterosclerosis y complicaciones vasculares ya que presentan una mayor concentración sérica de moléculas de adhesión que los sujetos control y mayor interacción leucocito-endotelio¹⁹⁹⁻²⁰¹ que además ha sido relacionado con el estrés oxidativo.^{202,203}

1.3.4. Desarrollo de aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico en respuesta a una agresión en el endotelio que provoca una acumulación de lípidos en la pared arterial haciendo reaccionar al sistema inmune que genera una inflamación, estrechamiento de la luz de las arterias pudiendo llegar a obstruir el flujo sanguíneo a órganos cercanos o incluso distantes por formación de un trombo.¹⁸⁴ La hiperglucemia, la IR 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. Además, los pacientes con T2D suelen presentar un perfil lipídico alterado con mayor proporción de partículas LDL pequeñas y densas, las cuales atraviesan más fácilmente la pared endotelial y son más susceptibles de oxidación, por tanto, más proaterogénicas.^{204,205} El flujo de estas partículas a través del endotelio tiene lugar de acuerdo con su gradiente de concentración y se realiza por un proceso de transcitosis que no está mediado por receptor y que se ve favorecido en los puntos de curvatura de las arterias, donde se producen turbulencias en el flujo sanguíneo. Al atravesar el endotelio, las LDL interactúan con los glucosaminoglucanos y

proteoglicanos presentes en la íntima, lo que favorece su retención.^{206,207} Las LDL circulantes que pueden ser resistentes a la oxidación debido a su contenido en antioxidantes, cuando son atrapadas en el endotelio y bajo condiciones de hiperglucemia (hecho que promueve la glucosilación), pueden sufrir oxidación en diferentes grados por ROS o diversas enzimas como mieloperoxidasa o lipooxigenasas liberadas por células inflamatorias.²⁰⁸ De esta manera, las LDL oxidadas inducen la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión en el endotelio, hecho que como se ha descrito previamente induce el reclutamiento e infiltración de monocitos a la pared arterial. Por tanto, el inicio del proceso aterosclerótico (Figura 7) se produce a través de dos eventos fundamentales que son favorecidos por la disfunción endotelial (i) internalización de LDL circulantes e (ii) internalización de leucocitos (principalmente monocitos), que al migrar al interior de la arteria se transforman en macrófagos. Los macrófagos tisulares endocitan las LDL oxidadas, transformándose en células espumosas y produciéndose de esta manera un acúmulo de colesterol en la pared arterial. 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.²⁰⁸

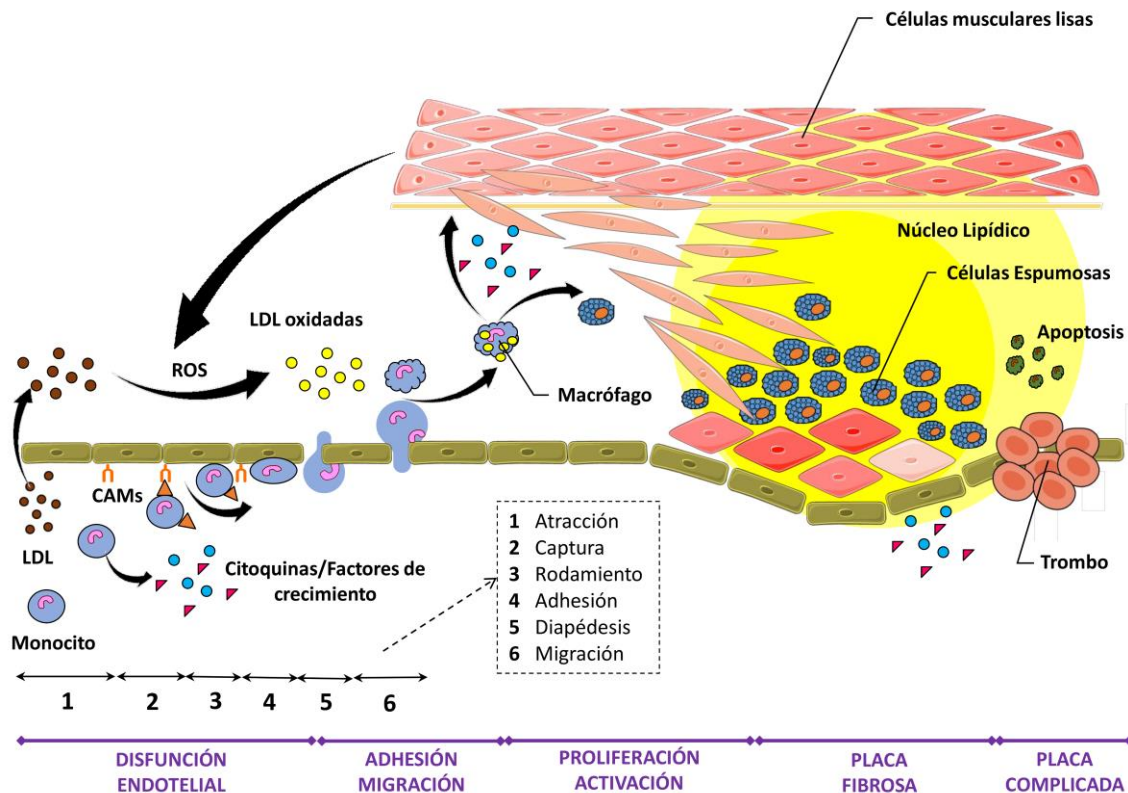


Figura 7. Proceso de adhesión de los leucocitos y formación de la placa aterosclerótica. Cuando el endotelio está dañado y se ve comprometido, permite el paso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) hacia el espacio subendotelial donde son oxidadas por especies reactivas de oxígeno (ROS). A su vez, las 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 y se produce su extravasación y migración hacia el foco de infección. Cuando los leucocitos atraviesan el endotelio 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, lo que produce un engrosamiento de la pared vascular. Con el tiempo, las plaquetas activadas y los componentes fibróticos también se acumulan en el lado luminal de la placa aterosclerótica, lo que invade aún más la luz de la pared del vaso y aumenta el riesgo de eventos aterotrombóticos.

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.²⁰⁹ En esta etapa final intervienen factores de crecimiento liberados por las células musculares lisas y el endotelio, como el factor de crecimiento de fibroblastos, favoreciendo la formación de la placa fibrosa y desarrollo de la lesión avanzada. En las lesiones ateroscleróticas las células musculares lisas están desorganizadas y pierden la capacidad reguladora del tono vascular. En el peor de los casos, las arterias afectadas son las coronarias y el resultado da lugar a una angina o infarto agudo de miocardio.²¹⁰

1.3.5. Consecuencias vasculares de la T2D

Los trastornos metabólicos asociados a la T2D conllevan el desarrollo de múltiples complicaciones crónicas ya que alteran la pared vascular con disminución del calibre intraluminal del vaso sanguíneo y dependiendo del tamaño de los vasos afectados pueden ser clasificadas en complicaciones microvasculares (nefropatía, retinopatía o neuropatía) o macrovasculares (si se ven afectados vasos de mayor calibre como las arterias coronarias, infarto de miocardio, angina de pecho, etc.). El desarrollo de estas complicaciones está ligado fundamentalmente al tiempo de evolución de la T2D y al mal control glucémico^{211,212} aunque por supuesto también intervienen otros factores, incluyendo la carga genética asociada a cada individuo, así como una posible asociación entre factores de riesgo cardiovascular.

En la T2D, para retrasar, minimizar y/o evitar la aparición de complicaciones es fundamental el mantenimiento de los niveles circulantes de glucosa dentro del rango fisiológico, de hecho, diferentes estudios observacionales e intervencionales han demostrado una asociación entre control glucémico por reducción en los niveles de HbA_{1c} y el desarrollo de complicaciones crónicas de la T2D. Aunque en fases tempranas, el manejo de la T2D sólo implica modificaciones en el estilo de vida y dieta, tras 9 años de dieta en el estudio UKPDS, solo el 9 % de los pacientes mantuvieron un buen control glucémico sin antidiabéticos orales ni insulina.²¹³ Además, en este estudio se observó que los pacientes que mantenían unos valores de HbA_{1c} inferiores a 7 % eran los que tenían menor riesgo de complicaciones,²¹⁴ comprendiendo, por tanto, que el principal objetivo terapéutico en el manejo de la T2D sea conseguir un nivel de HbA_{1c} en sangre $\leq 6,5$ % según las recomendaciones del Colegio Americano de Endocrinología²¹⁵ o < 7 % según las guías de la ADA.²¹⁶ Concretamente en el estudio UKPDS, por cada disminución del 1 % en los niveles de HbA_{1c} se presentó una reducción del 21 % en el riesgo de muerte relacionada con diabetes, 14 % de infarto de miocardio y 37 % en el desarrollo de complicaciones microvasculares. Por su parte, en el estudio DIGAMI se demostró una reducción del 28 % en mortalidad cardiovascular mediante tratamiento intensivo con insulina en infusión continua en pacientes diabéticos con infarto agudo de miocardio.²¹⁷ El estudio Steno-2 mostró que el tratamiento intensivo frente al tratamiento convencional de la diabetes, dislipemia, HBP, antiagregación y microalbuminuria conduce a una reducción significativa del 53 % en enfermedad cardiovascular, 58 % en retinopatía, 61 % en nefropatía y 63 % neuropatía autónoma tras 7,8 años de seguimiento en pacientes diabéticos con microalbuminuria.²¹⁸ Si bien es cierto, hasta la publicación en 2007 del estudio ACCORD, nunca se había indicado un límite inferior de HbA_{1c} a partir del cual no se redujese el riesgo de complicaciones y, sin embargo, este estudio concluyó que el mayor número de hipoglucemias inherentes al tratamiento intensivo con rosiglitazona podrían haber precipitado un episodio de enfermedad cardiovascular y de ahí, el aumento en la mortalidad cardiovascular.^{219,220} Sin embargo, estudios similares como el ADVANCE, lejos de mostrar un aumento de mortalidad, tras cinco años de seguimiento se consiguió el objetivo HbA_{1c} de 6,5 % en los pacientes T2D que recibieron tratamiento intensivo vs 7,3 % en los que recibieron tratamiento estándar lo cual estuvo acompañado de una reducción del 10 % en el riesgo relativo de enfermedades macro- y microvasculares, destacando la reducción conseguida en el desarrollo de nefropatía del 21 %.

Las complicaciones vasculares son muy comunes entre los pacientes con T2D y cabe destacar, además, que según estimaciones recogidas en la literatura, en esta población diabética frente a la población general, existe un riesgo relativo de 2-4 veces mayor en el desarrollo de complicaciones macrovasculares y de 10-20 veces mayor para complicaciones microvasculares.
222

1.3.5.1. Complicaciones microvasculares

Las complicaciones microvasculares caracterizadas por la afectación de vasos de pequeño calibre están relacionadas con la duración y severidad de la hiperglucemia,^{211,212} que afecta principalmente a aquellas células incapaces de regular su captación. Por tanto, la hiperglucemia intracelular puede dañar las células endoteliales de los capilares de la retina, las células mesangiales del glomérulo renal, las neuronas y las células de Schwann de los nervios periféricos desencadenándose el desarrollo de retinopatía, nefropatía y neuropatía, respectivamente.^{71,223} Se estima que la prevalencia de las complicaciones microvasculares entre la población diabética ronda aproximadamente el 30 % para la retinopatía,²²⁴ el 20-40 % para la nefropatía^{225,226} y el 13-45 % en el caso de la neuropatía²²⁷ comprometiendo en gran medida la calidad de vida de estos pacientes. Entre las complicaciones microvasculares, cabe destacar la nefropatía diabética (definida como una persistente proteinuria y albuminuria y/o descenso de la tasa de filtrado glomerular estimado mantenido en el tiempo) como principal causa de insuficiencia renal que aparece de manera progresiva, conduciendo al paciente a una dependencia de la diálisis para suplir la función renal y, aproximadamente, el 10 % de las muertes en pacientes con T2D se deben a fallo renal.²²⁷

1.3.5.2. Complicaciones macrovasculares

La T2D afecta también a los vasos de mayor calibre como las arterias que irrigan el cerebro, el corazón y las extremidades inferiores, dando lugar a enfermedades cardiovasculares tales como accidente cerebrovascular, angina estable e infarto de miocardio, representando en conjunto un 52 % de las muertes en pacientes con T2D.²²⁸ La enfermedad arterial periférica y el fallo cardíaco son las manifestaciones más comunes en la fase inicial de enfermedad cardiovascular²²⁹. Es de destacar que los pacientes con T2D tienen el doble de probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular²³⁰ y además ocurre 14,6 años antes que en personas no diabéticas.²³¹ Entre las complicaciones macrovasculares, la cardiopatía isquémica representa la principal causa de morbilidad y mortalidad en la población diabética. En este contexto, el proceso de aterosclerosis es clave ya que está vinculado al 80 % de las muertes en pacientes diabéticos.²³²

La mortalidad del paciente diabético oscila en torno al 20 % de forma similar que la de un paciente no diabético que ha sufrido un evento cardiovascular,²³³ por ello desde el punto de vista preventivo, las intervenciones recomendadas en ambos casos son las mismas siendo de primordial importancia el control estricto de la tensión arterial y del peso corporal junto con un control intensivo de los niveles de glucosa y lípidos circulantes para minimizar el riesgo de complicaciones y el progreso de la enfermedad.

1.4. Antioxidantes en la T2D

En los pacientes con T2D existe un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y oxidantes. De hecho, se ha demostrado que presentan una disminución de los niveles plasmáticos de enzimas antioxidantes, de glutatión y de vitaminas antioxidantes,^{234,235} que normalmente viene acompañado de un aumento de la peroxidación lipídica mediada por ROS.

Los antioxidantes de la dieta juegan un papel clave en la defensa frente a enfermedades como la diabetes, el cáncer y la enfermedad cardiovascular, ya que inactivan los radicales libres implicados en el estrés oxidativo e impiden su propagación. La suplementación con antioxidantes naturales podría tener un efecto beneficioso en la prevención de las complicaciones crónicas asociadas a la T2D, mejorando la morbimortalidad de los pacientes diabéticos. Sin embargo, los resultados obtenidos en los diferentes estudios que se han venido realizando desde hace décadas, mediante el uso de estrategias que disminuyan el estrés oxidativo, han sido controvertidos. En un estudio realizado en ratas diabéticas, la suplementación con vitaminas C y E redujo la peroxidación lipídica y mostró un aumento de la actividad SOD, CAT y GPX en el riñón, así como una disminución del peso de los riñones, grosor de la membrana basal glomerular y excreción de albúmina en la orina, sugiriendo un posible efecto beneficioso en el tratamiento de la nefropatía diabética.²³⁶ Además, otros muchos 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 T2D. La mayoría de los estudios realizados han utilizado la vitamina E aislada o en combinación con otros antioxidantes. Las dosis de vitamina E empleadas son de 300 a 1800 UI al día, generalmente en forma de α -tocoferol. En este sentido, recientemente se ha publicado un metaanálisis que incluyó 30 ensayos clínicos aleatorizados en el que Balbi y colaboradores concluyeron que la suplementación con vitaminas antioxidantes en pacientes con T2D, podría mejorar la capacidad antioxidante y el control glucémico, lo que podría suponer una estrategia para modular las

complicaciones de la T2D.²³⁷ Sin embargo, otros trabajos no pudieron demostrar un beneficio significativo de la suplementación con vitaminas antioxidantes sobre el control glucémico en pacientes con T2D.²³⁸ Éste es un tema que sigue suscitando gran controversia y la evidencia científica actual parece apoyar el hecho de que estos compuestos puedan disminuir la peroxidación lipídica, la oxidación de las partículas de LDL y mejorar la función endotelial y la vasodilatación dependiente del endotelio, sin mejorar de forma significativa el control metabólico de estos pacientes.

1.4.1. La mitocondria como diana terapéutica

Como bien hemos descrito anteriormente, las mitocondrias son los orgánulos encargados del abastecimiento energético de las células eucariotas, sin embargo, en los últimos años hemos sido testigos gracias a los grandes avances logrados en el estudio de la mitocondria de que lejos de ser una simple fábrica de ATP, la mitocondria alberga en su interior moléculas que una vez liberadas al citoplasma conducen a la activación de cascadas de señalización que pueden desencadenar diferentes procesos biológicos como por ejemplo la muerte celular. Progresivamente se van conociendo diversas funciones de estos orgánulos y las mitocondrias van siendo reconocidas como elementos clave en distintas áreas de la ciencia biomédica sugiriéndose, por tanto, que el estudio de fármacos y moléculas que modulen la función mitocondrial, podría permitir un mejor abordaje terapéutico de diversas patologías.

En primer lugar, sabemos que la mitocondria, y en concreto su matriz, es el escenario donde a través de la fosforilación oxidativa se genera poder reductor en forma de NADH y FADH₂, que son utilizados como donantes de electrones en la cadena respiratoria. Acoplado al transporte de electrones, tiene lugar la salida de protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana originándose, entre estos dos compartimentos, un gradiente electroquímico. Esta energía es empleada para fosforilar las moléculas de ADP a través del complejo V, o ATP sintetasa, localizado en la membrana interna y generándose así ATP al tiempo que los protones, a favor de gradiente, vuelven a la matriz.²³⁹ Por otro lado, gracias a su capacidad para internalizar Ca²⁺, la mitocondria también desempeña un papel clave, junto al ER, en la regulación de los niveles citoplasmáticos del catión de calcio libre.²⁴⁰ Por último, se ha propuesto a la mitocondria como principal fuente de ROS intracelular, ya que debido al carácter reactivo y potencial redox negativo de los transportadores de electrones que intervienen en la cadena respiratoria, de forma paralela a la reducción del O₂ por la citocromo C oxidasa para producir H₂O, eventualmente tiene lugar la reducción de un electrón del O₂, generando O₂^{•-}. Esta producción se ha relacionando en diversos estudios con diferentes vías de señalización implicadas en

algunos procesos citotóxicos esenciales en el envejecimiento y la senescencia.^{241,242} A su vez, es de destacar que la producción de otras especies como el H_2O_2 se origina a través de la dismutación de O_2 mediada por la MnSOD, o como $\cdot OH$ generado a través de la reducción del H_2O_2 en presencia de metales de transición reducidos.²⁴³

Las mitocondrias generan continuamente ROS por lo que su exposición inmediata y prolongada a estas especies hace que los componentes mitocondriales como DNA, proteínas y membranas sean especialmente vulnerables al daño oxidativo. En primer lugar, el DNA mitocondrial puede acumular mucho más daño oxidativo debido a su proximidad a la fuente de liberación de ROS, sistemas de reparación menos sofisticados y ausencia de histonas que proporcionen protección física al DNA nuclear de ataques exógenos.²⁴⁴ En segundo lugar, las proteínas mitocondriales también son particularmente susceptibles al daño oxidativo debido a la presencia de uniones de Fe-S en su estructura que son susceptibles a la inactivación del oxidante, y también a los residuos tiólicos que son vulnerables a la nitrosilación por RNS.²⁴⁵ Así, las proteínas que integran los complejos de la ETC pueden verse afectados por ROS/RNS,²⁴⁶ de manera que el estrés oxidativo acabe comprometiendo la función mitocondrial al reducir su afinidad por coenzimas y sustratos,⁹⁶ y, de hecho, el complejo I es especialmente vulnerable puesto que es uno de los principales sitios de generación de ROS en la mitocondria y la alteración de su función desencadena de nuevo una mayor liberación de ROS conduciendo a un círculo vicioso de disfunción mitocondrial adicional.⁹⁸ El deterioro del complejo I es particularmente clave en la función mitocondrial ya que, en términos relativos, la IMM contiene menor cantidad de complejo I que del resto de complejos de la ETC y, por tanto, el daño producido sobre éste tiene un mayor impacto en la función mitocondrial.⁹⁹

Por último, se sabe que los fosfolípidos que componen las membranas mitocondriales son ricos en ácidos grasos insaturados y, por lo tanto, son muy susceptibles a la peroxidación lipídica por ROS. En este sentido, uno de los lípidos particularmente afectado por el daño oxidativo es la cardiolipina, componente esencial de la IMM, ya que está constituido exclusivamente por ácidos grasos poliinsaturados y está estrechamente relacionado con los complejos de la ETC.²⁴⁷ Este daño oxidativo puede resultar especialmente relevante ya que, cuando la integridad y la función de la IMM se ven comprometidas, la energía acumulada en forma de gradiente electroquímico se disipa a través de la fuga de protones, que compromete aún más la OXPHOS mitocondrial.²⁴⁸

El estrés oxidativo se ha relacionado con la fisiopatología de una amplia variedad de enfermedades tales como HBP, apoplejía, diabetes, trastornos neurodegenerativos, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer y enfermedades metabólicas y cardiometabólicas.²⁴⁹ No es de extrañar que la investigación de los últimos años se haya enfocado en el análisis de moléculas con capacidad antioxidante como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades relacionadas con estrés oxidativo. De hecho, se ha descrito que elevadas cantidades de antioxidantes son efectivas en muchos modelos animales de enfermedades asociadas con el daño oxidativo. Sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos clínicos humanos con antioxidantes han sido en muchos casos decepcionantes y no concluyentes.^{250,251} En este sentido, los resultados hasta la fecha son contradictorios, por ejemplo, se ha demostrado que el suplemento con vitamina E mostró un efecto protector en la enfermedad cardiovascular en el estudio CHAOS²⁵² pero no en el ensayo GISSI-Prevenzione,²⁵³ o, por ejemplo, la ingesta de vitamina C por debajo de la cantidad diaria recomendada se asocia con un mayor daño oxidativo al DNA^{254,255} pero, paradójicamente, también lo es la suplementación con elevadas dosis de vitamina C.²⁵⁶ En cuanto al efecto de la administración de altas dosis de antioxidantes en el desarrollo de cáncer, puede resumirse que no hay evidencia de efectividad a menos que haya deficiencia dietética preexistente,^{257,258} mientras que para la demencia aunque existe cierta evidencia consistente con la efectividad limitada de la vitamina E para retardar su progresión, la información es muy variada y no concluyente.^{259,260} Por lo tanto, es de destacar que estos resultados contradictorios puedan deberse a las acciones diferenciales de los antioxidantes dependiendo de su concentración, ejerciendo acciones prooxidantes además de la actividad antioxidante, especialmente en presencia de metales de transición o cuando se emplean a altas concentraciones.^{261,262} Otra posibilidad es que algunos de los antioxidantes no alcancen las dianas relevantes de la generación de ROS, como es el caso de la mitocondria. En general, las proteínas de elevado peso molecular, como la SOD, no penetran en las membranas celulares y, por lo tanto, son ineficaces en muchos casos contra las ROS intracelulares. Los antioxidantes, como la vitamina E y la coenzima Q, son muy lipófilos y tienden a retenerse en las membranas celulares, por lo que se ha considerado que el antioxidante ideal debe ser permeable a las células y ser capaz de alcanzar a las mitocondrias donde puedan protegerlas eficazmente contra el daño oxidativo.

Teniendo en cuenta el papel clave que desarrollan las mitocondrias en la fisiopatología humana, estos orgánulos son una diana farmacológica evidente. De hecho, en estudios han evaluado diferentes compuestos con diana en la mitocondria para aliviar su disfunción en diferentes

situaciones patológicas.²⁶³ Estos estudios se han desarrollado con diferentes objetivos y mecanismos de acción, incluido el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} , la regulación de la dinámica mitocondrial, la estimulación de la biogénesis mitocondrial o la regulación de la apoptosis y, en particular, el estrés oxidativo.²⁶⁴ La terapia dirigida de fármacos a territorios subcelulares específicos es una vía terapéutica prometedora para el tratamiento de muchas enfermedades ya que mejora la eficacia de los compuestos mediante la acumulación del fármaco cerca del objetivo específico y la reducción de las consecuencias perjudiciales de su localización subcelular. Además, los sistemas de administración dirigida a dianas específicas pueden mejorar ciertas características del compuesto y, por lo tanto, superar las limitaciones clásicas de la administración de medicamentos convencionales, como la baja biodisponibilidad, la insolubilidad y la resistencia a los medicamentos.

Inciendo en la importancia de la función mitocondrial, el desarrollo de métodos y vehículos para el suministro selectivo y eficaz de fármacos a estos orgánulos es actualmente uno de los focos de la investigación farmacológica molecular. Incluso cuando el compuesto tiene las propiedades fisicoquímicas adecuadas para superar las barreras anatómicas, inmunológicas y bioquímicas para llegar al tejido y las células objetivo, aún tendría que atravesar varias membranas para alcanzar su destino final dentro de la mitocondria. Este proceso limita enormemente su acción en el sitio específico dentro de este orgánulo, por lo tanto, es necesario dirigir selectivamente el fármaco a la localización mitocondrial. La orientación a fármacos mitocondriales es un proceso complejo que depende de la naturaleza particular de estos compartimentos celulares, incluida la presencia de transportadores específicos ubicados en la membrana mitocondrial. Como bien se ha mencionado, la difusión a través del IMM es difícil puesto que los compuestos dirigidos a las mitocondrias deben encapsularse dentro de un transportador de moléculas farmacológicas. Además, esta encapsulación y la posterior liberación del compuesto dentro de la mitocondria deben preservar la estabilidad/actividad del fármaco. En cuanto al desarrollo de portadores eficientes, se han realizado grandes avances en los últimos tiempos conociéndose aquellas características que debe presentar un candidato adecuado: (i) capacidad para unirse a la forma farmacológicamente activa del fármaco o un profármaco (ii) un sistema de transporte eficiente que lleve el medicamento al sitio de su acción (iii) focalización específica y selectiva al compartimento mitocondrial y (iv) liberación del fármaco dentro de la mitocondria. Las estrategias actuales para la administración mitocondrial de fármacos incluyen la orientación pasiva y activa.²⁶⁵ En el caso de la orientación activa, se aprovechan las interacciones específicas que tienen lugar en los sitios mitocondriales, incluidas las asociaciones ligando-receptor y la unión antígeno-anticuerpo, y aprovechan la

compatibilidad entre las propiedades fisicoquímicas de la molécula portadora (carga eléctrica, hidrofiliidad, tamaño y masa) y los del compartimento mitocondrial. Debido a las propiedades morfológicas mitocondriales, la selección pasiva de estos orgánulos es difícil, por lo que se están desarrollando estrategias de focalización activa. Las moléculas se han dirigido de manera eficiente a las mitocondrias *in vivo* mediante varias estrategias de focalización: encapsulación dentro de liposomas,²⁶⁵ la conjugación con los cationes lipofílicos²⁶⁴ y la incorporación en péptidos dirigidos a las mitocondrias.²⁶⁶

1.4.2. Antioxidantes mitocondriales

1.4.2.1. Mitoquinona

El antioxidante dirigido a la mitocondria mejor caracterizado hasta la fecha es la mitoquinona (MitoQ), que contiene el radical antioxidante ubiquinona unido covalentemente al catión lipófilo trifenílfosfonio (TPP) por una cadena alquilo de 10 carbonos.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Existen diferentes cationes lipófilos útiles en la acumulación mitocondrial de antioxidantes, pero el más utilizado es el TPP. Los cationes TPP utilizan los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) para facilitar su acumulación selectiva dentro de la matriz mitocondrial,²⁷⁰ pueden pasar fácilmente a través de las bicapas de fosfolípidos debido a que su carga se disipa de manera efectiva y está rodeado por una matriz química orgánica protectora que permite su acumulación en la matriz mitocondrial en respuesta al $\Delta\Psi_m$ ²⁷¹. Este proceso puede ser explicado por la ecuación de Nernst que indica que, bajo condiciones biológicas normales, la captación de cationes lipofílicos en las mitocondrias aumenta 10 veces por cada 61,5 mV de $\Delta\Psi_m$, lo que lleva a una acumulación de 100 - 1000 veces.²⁷¹ La captación celular de MitoQ es mucho más rápida que la del metil-TPP (mTPP), probablemente debido a que su mayor hidrofobicidad reduce la energía de activación disponible para el paso a través de la membrana plasmática. Cuanto más larga es la cadena alquilo de la molécula, mayor es la acumulación mitocondrial. En este contexto, MitoQ, que tiene una cadena alquilo de 10 átomos de carbono, muestra un rendimiento óptimo. La captación de MitoQ se produce principalmente en las mitocondrias y no en otros compartimentos celulares, como lo confirma el hecho de que su acumulación en las células se bloquea en gran medida cuando $\Delta\Psi_m$ es alterado por el desacoplador carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidracona (FCCP). Una vez dentro de las mitocondrias, los cationes TPP se posicionan principalmente en la superficie de la matriz mitocondrial de la bicapa de fosfolípidos, con el grupo funcional y enlazador posicionados dentro de la IMM.²⁶⁷ El grado en que los cationes TPP se anclan a la IMM depende de la hidrofobicidad de la molécula y de la longitud del grupo funcional y enlazador. Así, la mayor

parte de MitoQ acumulado se adsorbe a la superficie de la matriz de la membrana interna, donde recicla continuamente su eficacia antioxidante, ya que cuando la forma de ubiquinol del MitoQ actúa como un antioxidante, se oxida a la forma de ubiquinona que se reduce rápidamente por el complejo II de la ETC a la forma de ubiquinol activo.^{268,272-274} MitoQ no puede restaurar la respiración en la mitocondria carente de coenzima Q debido a que la forma de ubiquinol reducida de MitoQ no se oxida por el complejo III²⁷³ y, por lo tanto, no puede actuar como portador de electrones. En consecuencia, la mayoría de los efectos de MitoQ que ocurren *in vitro* probablemente se deben a la acumulación de la forma de ubiquinol antioxidante, aunque la forma de quinona también puede reaccionar directamente con el O_2^{\cdot} .²⁷⁵ Debido a su capacidad para penetrar profundamente en el núcleo de la membrana, se cree que es un eficaz antioxidante contra la peroxidación lipídica.^{268,276} También se ha demostrado que MitoQ protege contra el daño por $ONOO^-$, y, además, puede reaccionar con $O_2^{\cdot-}$, aunque, como con otros ubiquinoles, su reactividad con H_2O_2 es escasa.²⁷² En resumen, en las mitocondrias aisladas, MitoQ parece cumplir la mayoría de los requisitos de un antioxidante dirigido a la mitocondria y, por tanto, puede tener efectos beneficiosos. Sin embargo, esta estrategia con cationes lipofílicos tiene algunas desventajas, como la sublocalización en la superficie de la matriz de la membrana interna, la toxicidad potencial de dosis altas y la capacidad de transferir solo moléculas de peso molecular neutro y bajo.

En general, los estudios realizados indican que la toxicidad de MitoQ es escasa y puede administrarse de forma segura en las concentraciones en las que suele utilizarse. Teniendo en cuenta que la respuesta bioenergética de las células depende en gran medida del número de mitocondrias y su regulación, es probable que el efecto de los compuestos de TPP sea dependiente del tipo celular y obviamente, estos efectos perjudiciales limitarían las cantidades que pueden emplearse de forma segura. En este sentido y aunque la toxicidad de dichas moléculas es escasa, teniendo en cuenta que en mitocondrias aisladas estos compuestos se concentran 5-10 veces debido al $\Delta\Psi_m$, se ha observado que la acumulación masiva de estos cationes lipófilos puede alterar la integridad de la membrana mitocondrial y desacoplar la OXPHOS como consecuencia de su adsorción a la superficie de la matriz de la IMM.²⁷⁷ En este sentido, el MitoQ también puede actuar como un prooxidante dada la capacidad de los derivados de ubiquinol para desprotonarse en agua formando ubiquinolato, lo que desencadena la formación de $O_2^{\cdot-}$.²⁷⁸ Esta actividad prooxidante es limitada si el resto de ubiquinol se mantiene en la fase lipídica, y también puede depender en gran medida de la

concentración empleada.²⁷⁹ De hecho, se ha demostrado que debido a esta acción prooxidante el MitoQ altera la respiración mitocondrial de manera dosis-dependiente.²⁸⁰

Los efectos producidos por el MitoQ como resultado de la interferencia no específica se evalúan utilizando decil-TPP (dTPP) como un compuesto control, que tiene una hidrofobicidad similar a la de MitoQ, pero carece del resto ubiquinol y, por lo tanto, no presenta propiedades antioxidantes. La función mitocondrial es interrumpida por MitoQ y dTPP en concentraciones similares, lo que implica que algunos de los efectos bioenergéticos y redox detectados y atribuidos a los antioxidantes dirigidos a la mitocondria son, de hecho, producidos por el grupo enlazador y son independientes del antioxidante.²⁷⁷

En general, en química médica los compuestos se desarrollan normalmente para interactuar con un objetivo específico en el sistema biológico, como un sitio de unión al receptor y para ello, a menudo es necesario realizar un examen preliminar para confirmar la solubilidad, la biodisponibilidad y la capacidad de un medicamento para atravesar bicapas de fosfolípidos.²⁸¹ Los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias basados en cationes lipofílicos TPP tienen varias propiedades inusuales: están dirigidos a un orgánulo, la mitocondria; para modificar un proceso general, el daño oxidativo; en lugar de un proceso específico y tienen la peculiar característica farmacológica de ser relativamente solubles en agua y permeables a la membrana. Por lo tanto, el diseño de MitoQ como agente farmacológico ha diferido un poco del de la mayoría de moléculas. El MitoQ pasa fácilmente a través de membranas biológicas y tiene elevada biodisponibilidad, y aunque su masa molecular es relativamente grande para un agente farmacéutico, tiene un alto coeficiente de partición salina tamponada con octanol y fosfato. Por lo tanto, si los cationes lipofílicos como MitoQ demuestran su potencial efectividad terapéutica, significaría un enfoque diferente y novedoso de la visión tradicional de la química médica y el descubrimiento de medicamentos o agentes con propiedades terapéuticas.

En la literatura, se recogen múltiples estudios que confirman la actividad antioxidante de MitoQ en varios procesos celulares, como la dinámica mitocondrial, la mitofagia y la muerte celular. Por ejemplo, MitoQ inhibe la fisión mitocondrial en líneas celulares expuestas a inhibidores de ETC²⁸² y también puede reducir la fisión mitocondrial en el modelo de células de 6-hidroxidopamina de la enfermedad de Parkinson.²⁸³ Otros estudios han constatado que MitoQ es beneficioso en diferentes patologías, que incluyen sepsis y enfermedades cardiometabólicas²⁷⁵. Como MitoQ tiene cargas positivas y está ubicado en la IMM, puede generar un pseudo- Ψ_m que, finalmente, promueve la autofagia en las células HepG2.²⁸⁴ También se han demostrado efectos beneficiosos de los antioxidantes mitocondriales en células β bajo condiciones de

hiperglucemia ²⁸⁵ y en modelos humanos y animales de tolerancia a la nitroglicerina en enfermedades cardiometabólicas, en las que el tratamiento con MitoQ mejora la función mitocondrial y la actividad aldehído deshidrogenasa 2. ²⁸⁶ En cuanto a las acciones beneficiosas de MitoQ en enfermedades cardiometabólicas, por ejemplo, el trabajo de Chacko y colaboradores demostraron que MitoQ mejora la función renal en un modelo animal de diabetes tipo 1. ²⁸⁷ En modelos animales de aterosclerosis y síndrome metabólico, MitoQ ha demostrado reducir la hiperglucemia y el daño al DNA y prevenir la hipercolesterolemia. ²⁸⁸ Otros estudios han demostrado que MitoQ disminuye la peroxidación lipídica en ratas obesas y mejora el perfil metabólico, restaura la circulación colateral coronaria inducida por isquemia y prolonga la supervivencia animal. ²⁸⁹ MitoQ también se ha empleado como un compuesto en la terapia contra el cáncer, ya que puede activar la apoptosis y la autofagia, ejerciendo así efectos citotóxicos en las células cancerosas. ²⁹⁰ Una posible explicación para esto es que las células cancerosas poseen un alto Ψ_m y que esta capacidad permite la acumulación de MitoQ. ²⁹¹ Además, las células cancerosas producen altas cantidades de ROS y alteran el equilibrio redox. Es de destacar que recientemente, se ha demostrado que MitoQ puede disminuir la integridad del DNA mitocondrial mediante la modulación de la producción de ROS y el $\Delta\Psi_m$ en líneas celulares de cáncer, como MDA-MB-231 y H23. ²⁹² La alteración de la integridad del DNA mitocondrial puede contribuir a la desregulación de la fosforilación oxidativa y reducir selectivamente los niveles de ATP en las células tumorales.

Además de numerosos estudios en modelos animales y celulares, en los últimos años también se han realizado estudios con MitoQ en humanos. En la búsqueda de una formulación estable comercialmente satisfactoria, la preparación del compuesto se fabrica en tabletas y se ha basado en el anión metanosulfonato cuya descomposición se inhibe por complejación con β -ciclodextrina. ²⁷⁵ Esta formulación ha pasado las pruebas convencionales de toxicidad en animales sin efectos adversos observables de 10,6 mg/kg. En estudios en humanos, MitoQ ha mostrado un comportamiento farmacocinético positivo cuando se administra por vía oral a 80 mg (1 mg/kg), lo que resulta en una C_{max} plasmática de 33,15 ng/ml, un T_{max} de aproximadamente 1 h, y un 10 % de biodisponibilidad oral. Esta formulación tiene buenas características farmacéuticas y existen dos ensayos clínicos en humanos en fase II. Por un lado, dado que existen múltiples evidencias que señalan al estrés oxidativo como posible causa patógena de la enfermedad de Parkinson, se evaluó la capacidad de MitoQ para ralentizar la progresión de esta enfermedad en el estudio PROTECT ²⁹³ en el cual no se observaron diferencias entre el grupo placebo y experimental, probablemente debido a que cuando esta

enfermedad es clínicamente evidente, aproximadamente el 50 % de las neuronas dopaminérgicas ya no son funcionales y el destino de las neuronas restantes ya esté determinado, por lo que la neuroprotección en esta etapa no podría prevenir su muerte. Por otra parte, el segundo ensayo en humanos realizado hasta la fecha con MitoQ fue el ensayo CLEAR²⁹⁴ en pacientes con virus de la hepatitis C crónica ya que éstos presentan elevado estrés oxidativo y hay evidencias de que el daño mitocondrial posterior juega un papel importante en el daño hepático. En este ensayo se ha encontrado que el MitoQ disminuye la alanina transaminasa sérica, pero no tuvo efecto sobre la carga viral, lo que indica que el antioxidante dirigido a las mitocondrias modula el daño hepático asociado con la infección por el virus de la hepatitis C, pero no inhibe la capacidad de éste para replicarse dentro del hígado. Los resultados de este ensayo, sugieren un potencial beneficio clínico de MitoQ en enfermedades hepáticas crónicas que involucran daño oxidativo mitocondrial, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

En definitiva, teniendo en cuenta la literatura actualmente disponible existe una larga lista de evidencias que sugieren prometedores efectos terapéuticos del MitoQ como antioxidante en diferentes tejidos, incluyendo la vasculatura a través de la protección contra el daño oxidativo y la consiguiente restauración de la función endotelial, así como en numerosos aspectos fisiopatológicos de diversas enfermedades que a través de la reducción del daño oxidativo podrían mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes.

1.4.2.2. Tetrapéptido SS-31

Otra forma comunmente utilizada para dirigir antioxidantes a la mitocondria es a través de la utilización de péptidos Szeto-Schiller (SS).³⁹⁵ Los péptidos SS representan una clase única de compuestos dirigidos a la mitocondria y constituyen una serie de tetrapéptidos sintéticos (SS-19 H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂, SS-02 H-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂, SS-31 HD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂, y SS-20 H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂) con tres cargas positivas en condiciones de pH homeostático²⁹⁶ que muestran un motivo de secuencia catiónico-aromático único, alternando residuos básicos y aromáticos. A pesar de ser muy solubles en agua son notablemente permeables a las células permitiendo su eficiente captación de manera no saturable e independientemente del estado energético. Los estudios celulares realizados *in vitro* han demostrado la rápida captación de estas moléculas a través de la membrana celular de una amplia variedad de tipos celulares, incluidas las células endoteliales, las células epiteliales renales e intestinales, los miotubos, los cardiomiocitos, los macrófagos y las neuronas.²⁹⁶⁻³⁰⁸ El mecanismo de captación celular de estos péptidos polares es consistente con la difusión, ya que su captación es lineal e

independiente de los procesos mediados por receptores o transportadores.²⁹⁷ La microscopía confocal con análogos marcados con fluorescencia ha sugerido que estos compuestos están localizados en las mitocondrias.²⁹⁶ Además de los marcadores fluorescentes, la distribución intracelular de estos péptidos se puede visualizar utilizando análogos biotinilados.³⁰⁸ Usando mitocondrias aisladas, se ha visto que la captación de los péptidos SS es rápida e independiente del $\Delta\Psi_m$, y los estudios de fraccionamiento han revelado que dentro de las células los péptidos SS se concentran de 1000 - 5000 veces en las mitocondrias, donde se unen a la IMM en lugar de localizarse en la matriz mitocondrial.^{296-298,309} Más recientemente, se ha descubierto que el SS-31 se une selectivamente a la cardiolipina a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.³⁰⁸

La cardiolipina es un fosfolípido que se expresa de forma exclusiva en la IMM³¹⁰ y a diferencia de otros fosfolípidos, es un dímero lipídico con dos grupos fosfato y cuatro cadenas laterales acilo, lo que le confiere una estructura cónica. Entre sus principales funciones, la cardiolipina es particularmente importante en la formación de las crestas mitocondriales³¹¹ desempeñando un papel clave en el mantenimiento de la fluidez y estabilidad osmótica de la IMM,^{312,313} también ayuda a organizar los complejos respiratorios en supercomplejos facilitando la transferencia óptima de electrones.³¹⁴⁻³¹⁸ Muchos de los complejos respiratorios y de las proteínas portadoras requieren cardiolipina para un ensamblaje y función óptimos.³¹⁹⁻³²⁵ Así, una interrupción en la formación del supercomplejo puede incrementar la producción de ROS a partir del complejo I.³²⁶ La cardiolipina también participa en el anclaje del citocromo C a la IMM y facilita la transferencia de electrones desde el complejo III al complejo IV.^{327,328} La peroxidación y reducción de la cardiolipina se ha observado en diversas patologías asociadas con la deficiencia de energía, incluida la insuficiencia cardíaca, las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes y la lesión por perfusión isquémica. Por tanto, además de suponer una diana mitocondrial, compuestos que puedan dirigirse e inhibir la peroxidación de la cardiolipina podrían ser potencialmente beneficiosos para estas enfermedades.

Desde luego, es de particular importancia y supone claramente una ventaja que la captación mitocondrial específica de estos compuestos no dependa del $\Delta\Psi_m$ ^{266,309,329} ya que la polarización de la membrana mitocondrial no se altera y no es un proceso autolimitante. Por lo tanto, los péptidos SS tienen características adecuadas que los hacen ideales para el tratamiento de muchas enfermedades relacionadas con la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, incluyendo enfermedades cardiovasculares y cáncer. Los péptidos SS son pequeños,

muy solubles en agua, fáciles de sintetizar y resistentes a la degradación de la peptidasa. La presencia de un D-aminoácido en la primera y la segunda posición los hace resistentes a la actividad de la aminopeptidasa, y debido a su estructura pueden llegar a las mitocondrias independientemente del tejido y la ubicación.³³⁰ En este sentido, el SS-02 ha demostrado que penetra fácilmente en una monocapa de células epiteliales intestinales tanto en dirección basolateral-apical como en dirección apical-basolateral así como la barrera hematoencefálica, una capacidad crucial en el desarrollo de fármacos para la neuroprotección.³³¹

Los péptidos SS tienen una actividad intrínseca en las mitocondrias, inhiben la peroxidación lipídica y están idealmente dirigidos para prevenir la peroxidación de cardiolipina por $\cdot\text{OH}$, así, su selectividad y concentración en la IMM los hace extremadamente potentes para reducir el estrés oxidativo mitocondrial.³³² Su acción antioxidante se atribuye al residuo tirosina o dimetiltirosina en su estructura, siendo éste último más efectivo con respecto a la eliminación de ROS debido a su mayor densidad electrónica en el anillo aromático. El residuo tirosina elimina los radicales de oxígeno formando radicales tirosilo que, a su vez, por acoplamiento pueden formar ditirosina o reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$ formando hidroperóxido de tirosina.³³³ Se cree que este residuo es capaz de destruir $\cdot\text{OH}$ y $\text{ONOO}\cdot$, y posiblemente los radicales HOCl y peroxilo, pero parece improbable una reacción directa con $\text{O}_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 . La ubicación específica de estos residuos no parece ser significativa, ya que el SS-31 es tan efectivo como el SS-02 en la eliminación de H_2O_2 y en la inhibición de la oxidación de LDL.³³⁴ Sin embargo, SS-20, que no contiene residuo tirosina o dimetiltirosina, no puede eliminar estos ROS. Se ha constatado que los péptidos SS son beneficiosos en condiciones de estrés oxidativo, tanto en modelos celulares de enfermedad como en mitocondrias aisladas, siendo el SS-31 el más eficiente.^{296,335,336} SS-31 ha mostrado efectos beneficiosos en condiciones de hiperglucemia; por ejemplo, previene la pérdida de Ψ_m y disminuye la liberación de citocromo C y la producción de ROS en células endoteliales de la retina en humanos.³⁰⁴ También ha demostrado efectos beneficiosos en los mioblastos C2C12 al disminuir la autofagia y la proteólisis bajo la privación de nutrientes o la exposición a la rapamicina.³³⁷ El tratamiento con SS-31 ha demostrado efectos positivos en enfermedades humanas y modelos animales en el contexto de infarto de miocardio,³³⁸ enfermedad de Alzheimer³³⁵ y obesidad.³³⁹ El SS-31 también disminuye los niveles de CD36, un receptor que puede promover la producción de ROS y el deterioro tisular bajo condiciones de isquemia.²⁹⁹ SS-31 también puede prevenir el estrés oxidativo y la autofagia en la enfermedad de Alzheimer protegiendo contra la toxicidad β amiloide y aumentando el transporte axonal de las mitocondrias y la viabilidad sináptica, y reduciendo las proteínas de fisión.³⁴⁰ Además, se ha demostrado que mejora la arquitectura glomerular en ratones de edad

avanzada y protege las mitocondrias después de la isquemia aguda,³⁴¹ previniendo el incremento de citoquinas proinflamatorias IL-18 e IL-1.³⁴²

En general, los estudios mencionados anteriormente han resaltado el potencial del SS-31 como agente beneficioso en diferentes enfermedades. SS-31 es el primer compuesto que se dirige a un fosfolípido específico en la IMM, la cardiolipina, para alterar las propiedades de la membrana y modificar la actividad de los complejos proteicos de la ETC mejorando la bioenergética mitocondrial. Los estudios llevados a cabo han demostrado que abordar un mecanismo tan fundamental puede tener efectos beneficiosos en enfermedades complejas y con múltiples comorbilidades. Es importante destacar que SS-31 no tiene ningún efecto sobre las mitocondrias no alteradas, lo que explica su excelente perfil de seguridad. La estabilidad del SS-31 se ha evaluado en plasma de diferentes mamíferos como rata, ratón, perro, mono y humano, presentando escasa degradación en incubaciones de 1 h a 37 °C mientras que con incubaciones más largas la degradación fue más rápida en plasma de ratas y ratones ($t_{1/2}$ ~1,8 y 3,6 h, respectivamente) en comparación con la relativa estabilidad presentada en plasma de perros ($t_{1/2}$ ~7,7 h), monos ($t_{1/2}$ ~4,3 h) y humanos ($t_{1/2}$ ~30,8 h). Los estudios de farmacocinética *in vivo* de SS-31 se han realizado en diversas especies de animales como ratas, perros y primates. Por ejemplo, la concentración plasmática de SS-31 disminuyó rápidamente en ratas tras la inyección intravenosa de 1 mg/kg ($t_{1/2}$ ~0,8 h) siendo a las 8 horas la concentración plasmática 1 nM, que es la concentración efectiva observada en la mayoría de los estudios de cultivos celulares.^{296,298,300,335,343,344} En cuanto a su administración subcutánea, el SS-31 se absorbe rápidamente detectándose el nivel plasmático máximo a los 15 min, siendo su volumen de distribución aparente muy pequeño, alrededor del 40 % del agua corporal total. En los estudios de biodistribución, las concentraciones más elevadas se determinaron en riñón a los 30 min de la administración subcutánea.^{337,374} La vida media de eliminación es de 2 h, suficiente para que la dosificación una vez al día alcance la eficacia farmacológica en estas especies. Lo más importante es que los niveles plasmáticos y la exposición al fármaco son proporcionales al rango de dosis 1-10 mg/kg utilizado en los estudios de eficacia preclínica.^{305,308,309,338,343,346-348} De acuerdo a los resultados tan prometedores de eficacia preclínica en diversos modelos animales obtenidos hasta la fecha y, su excelente perfil farmacocinético, SS-31 ha entrado en desarrollo clínico con un patrocinador comercial usando una formulación llamada Bendavia. Varios estudios de fase I han evaluado su seguridad, tolerabilidad y farmacocinética en sujetos sanos con dosis intravenosas y orales.

Los esfuerzos actuales en el descubrimiento de nuevos fármacos tienden a centrarse individualmente para cada enfermedad en objetivos de proteínas y vías de señalización, basándose principalmente en estudios de genómica y proteómica. Actualmente el campo emergente de la lipidómica está llamando la atención como nuevo objetivo farmacológico. Los cambios en la composición lipídica de una membrana no solo pueden alterar la fluidez y el plegamiento de una membrana, sino que también pueden cambiar profundamente la organización y función de numerosas proteínas en la membrana. La complejidad del lipidoma es igual o superior a la del proteoma y brinda enormes oportunidades para el desarrollo de fármacos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años, la sociedad ha experimentado ciertos cambios en el estilo de vida que han conducido a un predominio del sedentarismo y a unos hábitos alimenticios caracterizados por una elevada ingesta calórica. La epidemia del sobrepeso y la obesidad que estamos sufriendo, está incrementando drásticamente la incidencia y prevalencia de alteraciones metabólicas como la T2D, una enfermedad compleja que implica una inflamación crónica de bajo grado, IR, estrés oxidativo, así como un perfil lipídico alterado. Las alteraciones que acompañan al desarrollo de T2D convergen para promover el desarrollo de disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular prematura con un impacto alarmante sobre la mortalidad y discapacidad a nivel mundial. Por tanto, el conocimiento y tratamiento de la T2D 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 las comorbilidades asociadas.

Numerosas evidencias reflejan la existencia de estrés oxidativo en la T2D, 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 esta 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 T2D. En este contexto, las células inmunitarias, activadas en la T2D, además de participar en la inducción de estrés oxidativo y jugar un papel fundamental en la inflamación crónica, desempeñan un papel clave en las primeras etapas del proceso aterosclerótico al ser reclutadas hacia la pared vascular. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos intracelulares en los leucocitos que pueden subyacer a este efecto. Los leucocitos pueden producir grandes cantidades de ROS para la defensa inmune cuando se activan; por lo tanto, una de las cuestiones que nos planteamos en la presente tesis es saber si el estrés oxidativo en los leucocitos puede alterar la interacción entre las células inmunes y el endotelio vascular.

Además, puesto que principalmente las mitocondrias son las responsables del estrés oxidativo y la producción de ROS en la célula y dado que la funcionalidad de este orgánulo se ve alterada por la sobrecarga metabólica en la T2D en paralelo con el desarrollo del estrés de ER, nos planteamos si el uso de antioxidantes con diana en la mitocondria, tales como el MitoQ y el SS-31, podría ser una herramienta terapéutica en el control de las enfermedades que conllevan estrés oxidativo. Concretamente nos hemos centrado en la T2D, debido a que dichos antioxidantes podrían modular la principal fuente de ROS y, por tanto, nos cuestionamos si

modular dicho mecanismo fundamental podría conllevar la regulación de otros mecanismos moleculares relacionados con éste, como por ejemplo, la regulación de los sistemas antioxidantes, el proceso inflamatorio, las interacciones leucocito-endotelio y el estrés de ER.

Por lo tanto, la realización de este proyecto de tesis doctoral plantea los siguientes objetivos:

1. Evaluar el posible efecto beneficioso del antioxidante mitocondrial MitoQ sobre el estrés oxidativo en leucocitos de pacientes con T2D, así como sobre las interacciones leucocito-endotelio y parámetros inflamatorios.
2. Estudiar el efecto del tratamiento de leucocitos de pacientes diabéticos tipo 2 con el antioxidante dirigido a la mitocondria SS-31 sobre la señalización inflamatoria, el estrés oxidativo y las interacciones leucocito-endotelio.
3. Estudiar el efecto del antioxidante mitocondrial MitoQ sobre el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el estrés de ER en células β pancreáticas bajo condición de glucolipototoxicidad.

3. PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la prevalencia de obesidad se ha incrementado de manera alarmante en todo el mundo y, según las estimaciones, la tendencia seguirá al alza si no se llevan a cabo medidas urgentes que la modulen. La T2D está relacionada en gran medida con la obesidad y, por lo tanto, con la IR, y el agravante deterioro de la función celular β pancreática. De hecho, los casos de T2D aumentan de forma paralela a la epidemia de la obesidad y la pesada carga asociada ha generado una creciente demanda de estrategias para frenar y/o mitigar sus efectos deletéreos sobre la salud, que limitan sustancialmente la calidad de vida de los pacientes. Por lo tanto, se requiere un alto nivel de compromiso por parte de los diferentes estratos sociales, incluida la comunidad científica internacional, no sólo para desarrollar estrategias preventivas que nos permitan combatir la patología y prevenir sus complicaciones asociadas sino también, para aumentar la comprensión de los eventos patológicos y los mecanismos involucrados, tanto desde el punto de vista básico como clínico.

En la presente tesis, hemos pretendido profundizar en los mecanismos subyacentes de la T2D, especialmente aquellos relacionados con el desarrollo de aterosclerosis, haciendo especial hincapié en el estudio de la activación de los leucocitos como 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 T2D, son clave en las primeras etapas del proceso aterosclerótico al ser reclutados hacia la pared vascular. Además, hemos llevado a cabo novedosos estudios con un enfoque terapéutico sobre esta enfermedad como son los antioxidantes dirigidos a la mitocondria, con el fin de intentar modular estas vías y prevenir las alteraciones metabólicas. Para ello, se han llevado a cabo estudios observacionales donde se han analizado diferentes cohortes de pacientes con T2D atendidos en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Dr. Peset. Así mismo, y con el fin de comparar los resultados con la población sana, se incluyeron en los estudios los correspondientes controles sanos ajustados por edad, sexo e BMI.

De manera general, la edad de los pacientes con T2D estudiados en las distintas cohortes empleadas en esta tesis, estaba en torno a los 60 años con al menos 2 años de evolución de la enfermedad. Todos los pacientes siguieron recomendaciones dietéticas y pautas para aumentar la actividad física y la gran mayoría estaba además bajo tratamiento farmacológico con agentes antidiabéticos orales, siendo la metformina el fármaco más utilizado y, en menor proporción, otros fármacos como sulfonilureas, glinidas, inhibidores de DPP-4 y tiazolidinedionas. 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. Como hacían prever estos datos y, como revelaron los elevados valores del índice de evaluación de IR con el modelo homeostático (HOMA-IR, del inglés *homeostasis model assessment of insulin resistance*), los pacientes diabéticos presentaron una marcada IR. Es importante recordar que en pacientes con T2D, el mantenimiento de un buen control glucémico es crucial a la hora de prevenir el desarrollo de complicaciones microvasculares tales como la nefropatía, retinopatía y neuropatía diabéticas ²¹⁴ ya que, bajo condiciones de hiperglucemia, los capilares de la microvasculatura de los riñones, ojos y tejidos periféricos se ven alterados. ^{71,211} Las principales recomendaciones de manejo de la T2D, recogidas en guías clínicas especializadas y elaboradas por expertos, aconsejan que los valores de HbA_{1c} no superen el 7%. ²¹⁶

En cuanto al perfil lipídico, en los pacientes diabéticos incluidos en nuestros estudios 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, ambas características distintivas de la dislipidemia aterogénica. La dislipidemia aterogénica (definida como niveles reducidos de HDL acompañados de hipertrigliceridemia y aumento de las partículas LDL pequeñas y densas) es bastante frecuente entre los pacientes con T2D, con una prevalencia del 35-56 %, y está estrechamente asociada con el riesgo cardiovascular ³⁴⁹. En el manejo de los pacientes con T2D, habitualmente se recurre al tratamiento farmacológico hipolipemiante para evitar alteraciones lipídicas y reducir el riesgo cardiovascular cuando los cambios en el estilo de vida no son suficientes. A diferencia del riesgo de complicaciones en los vasos de pequeño calibre, cuyo principal desencadenante es la hiperglucemia, se estima que gran parte del riesgo de complicaciones macrovasculares en la T2D es consecuencia de la dislipemia. ³⁵⁰ En casos de alto riesgo en los que la terapia de primera línea con estatinas no es suficiente para disminuir los niveles de LDL, se suelen recurrir a otros fármacos como ezetimibe o fenofibratos para la optimización de los niveles de la triada lipídica: colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos, y así reducir el riesgo cardiovascular. ³⁷ En nuestros estudios, aproximadamente el 65 % de los pacientes diabéticos seguían tratamiento con estatinas, mientras que algo más del 10 % tomaban fibratos, y una pequeña parte (menos de un 6%) estaban tratados con ezetimibe. Por este motivo, los niveles de colesterol total y de LDL de los pacientes con T2D estaban disminuidos con respecto a los controles como consecuencia del tratamiento hipolipemiante.

La presencia de HBP fue otra característica presente en los pacientes diabéticos en estudio con respecto a los controles, a pesar de que, casi la mitad de los pacientes diabéticos estudiados se encontraban bajo algún tipo de terapia antihipertensiva. La HBP es un factor de riesgo más para

el desarrollo de complicaciones cardiovasculares en la diabetes mellitus, tanto macro- como microvasculares.³⁴ En este sentido, Chen y colaboradores diseñaron un estudio para evaluar la importancia de la presión arterial sobre el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares en pacientes diabéticos y observaron que aquellos que en el momento de diagnóstico de la diabetes eran hipertensos, tenían más eventos cardiovasculares que los diabéticos normotensos y, concluyeron que la HBP en pacientes diabéticos se asociaba con un aumento del 57 % en el riesgo de eventos cardiovasculares.³⁵¹ Son múltiples los factores que influyen de manera simultánea en el desarrollo de HBP en la T2D y, probablemente, la influencia de cada uno de ellos varía en cada paciente, pero entre los factores que condicionan el incremento de la presión arterial en la T2D cabe destacar: un aumento del volumen extracelular y un incremento de las resistencias vasculares periféricas. Sobre el primer factor, actuarían los efectos derivados del hiperinsulinismo y la hiperglucemia; sobre el segundo, los derivados de la activación simpática y la rigidez arterial.

A su vez, la población diabética en estudio presentó un BMI y perímetro abdominal significativamente superior al de los controles, así como un aumento de los niveles de CRP, indicativo de una inflamación sistémica de bajo grado y cuyos niveles son predictores de riesgo cardiovascular³⁵² y promotor de un fenotipo proaterosclerótico en la vasculatura.^{353,354} Dado que el ajuste por BMI hizo desaparecer las diferencias observadas en los niveles de CRP entre diabéticos y controles, consideramos que el exceso de peso presente en nuestra población diabética juega un papel importante en este marcador. La inflamación sistémica de bajo grado es un distintivo relevante de la obesidad ya que el balance calórico positivo que tiene lugar, provoca la hipertrofia de los adipocitos e incrementa la secreción de citoquinas proinflamatorias y la infiltración progresiva de macrófagos al tejido adiposo, hecho que aumenta todavía más la liberación de estas citoquinas hacia la circulación¹⁶¹ implicando la disfunción del tejido adiposo, y por tanto, la estimulación en exceso de las células inmunitarias y alteración de la función vascular. La liberación de citoquinas proinflamatorias por los monocitos o macrófagos activados y por los adipocitos, son especialmente relevantes en el contexto de obesidad y T2D por su papel decisivo en el desarrollo de IR.^{355,356} Es de destacar que la IL-6, es responsable de inducir la síntesis hepática de proteínas de fase aguda como la CRP o el fibrinógeno con efectos pleiotrópicos en diferentes tejidos.³⁵⁷ Del mismo modo, existe una sobreproducción de TNF α por parte del tejido adiposo perivascular y las células inmunes, asociada no solo con la IR sino también con la función endotelial alterada, especialmente a través de una reducida disponibilidad de NO, lo que conlleva un mayor riesgo de eventos coronarios.^{172,358} De acuerdo

con estos hechos, en nuestro laboratorio hemos demostrado que en humanos hay una marcada presencia de citoquinas proinflamatorias circulantes, en concreto, IL-6 y TNF α , en suero de pacientes diabéticos con respecto a sujetos sanos.²⁰⁰ Además, en pacientes obesos se ha observado que a medida que aumenta el BMI, existe un incremento del HOMA-IR a la vez de un aumento gradual sistémico de los marcadores inflamatorios IL-6, CRP y TNF α .³⁵⁹ A diferencia del proceso clásico de inflamación originado por una infección, este estado de inflamación subclínica crónica y de bajo grado se produce en respuesta a estímulos metabólicos. Al profundizar en el estudio de esta situación inflamatoria, se ha mostrado que existe una alteración del sistema inmune y se han observado cambios en el estado de activación y número de leucocitos circulantes que contribuyen a la liberación de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias.¹⁴⁵ Bajo estas condiciones, se sabe que las células endoteliales, en respuesta a las citoquinas proinflamatorias, inducen la producción de moléculas de adhesión tales como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1³⁶⁰ a través de las cuales se media el proceso de rodamiento, adhesión y transmigración de los leucocitos a lo largo de las paredes endoteliales de los vasos sanguíneos dando lugar al inicio del proceso aterosclerótico, en muchos casos prematuro, que se encuentra íntimamente relacionado con el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes.²⁰⁸ De hecho, en nuestra población diabética se ha encontrado un aumento en la interacción de los leucocitos con el endotelio, observándose un mayor flujo de leucocitos en rodamiento sobre el endotelio y una menor velocidad de rodamiento con respecto a los sujetos control. Estos resultados muestran que los leucocitos de pacientes con T2D tienden a frenarse cuando se acercan a las células endoteliales, y en consonancia, también se ha observado un incrementado número de leucocitos que permanecen adheridos al endotelio. Para llevar a cabo el estudio de estas propiedades de dinámica leucocitaria (críticas para la homeostasis e integridad del sistema vascular) se empleó un sistema *in vitro* simulando el flujo sanguíneo en humanos.³⁶¹ En este sistema, perfundimos una suspensión de leucocitos humanos aislados sobre una monocapa de células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC, del inglés *human umbilical vein endothelial cells*) a través de una cámara de flujo paralelo acoplada a un microscopio invertido. De manera que, reproduciendo las condiciones de flujo y temperatura observadas en condiciones fisiológicas, determinamos tres parámetros: (i) 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), (ii) la velocidad de rodamiento leucocitario (el tiempo que tardan 20 leucocitos consecutivos en recorrer una distancia de 100 μm) y (iii) adhesión leucocitaria (número de leucocitos que mantienen un contacto estable de al menos 30 s con la monocapa de HUVEC). Además, esta 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.¹⁸⁴ Los leucocitos, una vez activados, son capaces de producir y liberar gran cantidad de ROS contribuyendo al estrés oxidativo y a la subsecuente inflamación y disfunción endotelial.³⁶² En nuestras investigaciones, decidimos emplear leucocitos de sangre periférica ya que, basándonos en lo anteriormente comentado, estas células son ideales para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la fisiopatología de la T2D. De hecho, estudios previos han demostrado la existencia de estrés oxidativo en leucocitos de pacientes con T2D y la activación de los mismos, destacando su posible papel en el desarrollo de complicaciones macro- y microvasculares,^{200,249,363} y han demostrado ser sensores del estrés oxidativo general en humanos. Tras evaluar por microscopía de fluorescencia la producción de ROS y los niveles de GSH en los leucocitos aislados de los sujetos de estudio, observamos que los pacientes con T2D presentaban un aumento en la producción de ROS, tanto totales como mitocondriales, y menor concentración intracelular de GSH en comparación con los leucocitos de controles sanos, apuntando a una alteración del estado redox. Cabe mencionar que para la evaluación de ROS totales a través de microscopía de fluorescencia hemos empleado el fluorocromo DCFH-DA y como somos conscientes de sus limitaciones (puesto que no reacciona solamente con el H₂O₂ y puede someterse a oxidación, conducir a la formación del radical DCF⁻ y a la amplificación artificial de la fluorescencia), no sólo hemos empleado MitoSOX para evaluar ROS mitocondriales y confirmar nuestros resultados, sino que además la especificidad de la respuesta observada se corroboró mediante el análisis del efecto de un control positivo, la rotenona, un inhibidor bien conocido del Complejo I de la ETC cuya acción induce la producción de superóxido mitocondrial. Se sabe que los radicales libres poseen una estructura birradicálica lo que implica que son muy reactivos y tienen una vida media corta, es decir, actúan cerca del sitio donde se forman, por tanto, las mitocondrias que sufren una continua exposición ya que constituyen la principal fuente de ROS a través de la ETC durante la respiración celular⁹⁵ pueden ser particularmente vulnerables al daño oxidativo. La producción mitocondrial de ROS tiene como una de las dianas principales la peroxidación de la membrana lipídica, concretamente la oxidación de la cardiolipina en la IMM que conduce a la reducción del $\Delta\Psi_m$, como hemos observado en los leucocitos de pacientes con T2D con respecto a los sujetos control. Las alteraciones en el $\Delta\Psi_m$ desequilibran el flujo de protones a lo largo de la ETC a través de los complejos y, puesto que este flujo de electrones resulta esencial para la generación de ATP en el complejo V, la producción de energía se ve comprometida. Estos resultados están en consonancia con estudios previos en los que se ha detectado una morfología mitocondrial alterada junto a una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y

una reducción de la masa mitocondrial en células mononucleares de pacientes con T2D.^{364,365} En el estudio de la fisiopatología de la T2D se han propuesto diversas estrategias enfocadas hacia la mejora del desequilibrio existente entre los mecanismos antioxidantes y oxidantes, ya que como muestran nuestros propios resultados, los pacientes diabéticos presentan niveles reducidos de defensas antioxidantes tales como glutatión. Los antioxidantes juegan un papel clave en la defensa frente a diversas enfermedades tales como diabetes, cáncer y enfermedad cardiovascular, ya que inactivan los radicales libres implicados en el estrés oxidativo e impiden su propagación. El antioxidante ideal debe ser permeable a las células y ser capaz de alcanzar las mitocondrias donde pueda protegerlas contra el daño oxidativo. Debido a la implicación esencial de las mitocondrias en la fisiopatología humana, en la búsqueda de potenciales estrategias terapéuticas para modular el estrés oxidativo asociado a la diabetes y a otras muchas enfermedades, el suministro de fármacos o moléculas dirigidas a estos orgánulos supone una vía alternativa muy prometedora ya que la acumulación del fármaco cerca del objetivo específico mejora la eficacia del compuesto, reduce los efectos nocivos de su localización subcelular fuera del objetivo y permite superar las limitaciones clásicas de la administración convencional: baja biodisponibilidad, insolubilidad y resistencia a los medicamentos. Basándonos en estos hechos, nos preguntamos si la suplementación con antioxidantes dirigidos a la mitocondria en los leucocitos de pacientes con T2D muestran algún tipo de mejora a nivel de estrés oxidativo e interacciones leucocito-endotelio en comparación con los leucocitos de pacientes no tratados con estos agentes antioxidantes y, de ser así, qué mecanismos moleculares podrían estar involucrados.

En la presente tesis concretamente profundizamos en los efectos en primer lugar del MitoQ, uno de los antioxidantes mitocondriales más estudiados dado que este compuesto es biocompatible y se puede administrar de forma segura *in vivo* puesto que, a las concentraciones empleadas no se han reportado efectos tóxicos. MitoQ es una quinona similar a la ubiquinona o coenzima Q 10 (CoQ10), un potente antioxidante liposoluble que procede de la dieta, pero también es sintetizado por el propio organismo a partir de tirosina, fenilalanina y acetil coenzima A. Este antioxidante se encuentra en todas las membranas celulares, principalmente en las mitocondriales, donde participa en la ETC y, por lo tanto, en la fosforilación oxidativa. Además, potencia la respuesta del sistema inmune (su capacidad de producir anticuerpos), y como antioxidante es capaz de impedir la peroxidación lipídica y proteger al DNA de la acción de radicales libres.³⁶⁶ CoQ10 se distribuye extensamente a través de la célula, sin embargo, el antioxidante MitoQ va dirigido específicamente a la mitocondria siendo el objetivo de su estudio, combatir el daño oxidativo desde el origen. De hecho, numerosos estudios han

constatado que MitoQ protege contra el daño oxidativo en modelos animales de diversas patologías tales como HBP,³⁶⁷ lesión por isquemia-reperfusión,³⁶⁸ nefropatía diabética,²⁸⁷ acidemia propiónica,³⁶⁹ etc. Concretamente, se ha confirmado su actividad antioxidante en varios procesos celulares como la dinámica mitocondrial, la mitofagia y la muerte celular. Por ejemplo, MitoQ inhibe la fisión mitocondrial en líneas celulares expuestas a inhibidores de la ETC²⁸² y también puede reducir la fisión mitocondrial en el modelo de células de 6-hidroxdopamina de la enfermedad de Parkinson.²⁸³ En modelos murinos de aterosclerosis y síndrome metabólico, MitoQ ha demostrado reducir la hiperglucemia y el daño al DNA y prevenir la hipercolesterolemia.²⁸⁸ Además, MitoQ disminuye la peroxidación lipídica en ratas obesas y mejora el perfil metabólico, restaurando el crecimiento colateral coronario inducido por isquemia y prolongando la supervivencia animal.²⁸⁹ Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento con MitoQ alivia la disfunción mitocondrial inducida en ratas con insuficiencia cardíaca, al disminuir la formación de H₂O₂, mejorar la respiración mitocondrial y facilitar la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.³⁷⁰

Los efectos de MitoQ que se producen en las mitocondrias como resultado de la interferencia no específica se evalúan utilizando como compuesto/vehículo control el dTPP, que no presenta propiedades antioxidantes puesto que carece del resto ubiquinol, pero tiene una hidrofobicidad similar a la de MitoQ. En este estudio, hemos observado que el tratamiento de los leucocitos de pacientes diabéticos con el antioxidante mitocondrial MitoQ reduce de forma significativa los niveles de ROS mitocondriales evaluados mediante la sonda fluorescente MitoSOX, mientras que no tuvo efecto sobre leucocitos de sujetos sanos. En consonancia con este efecto antioxidante, cuando se evaluaron los niveles de GPX1 por western blot, no se observaron diferencias significativas entre los sujetos diabéticos y control, pero el tratamiento con MitoQ incrementó de forma significativa la expresión proteica de esta enzima encargada de la detoxificación de los peróxidos mediante su reducción. Cabe destacar que, en los experimentos de los leucocitos en los sujetos control, la incubación con dTPP no tuvo ningún efecto sobre los parámetros de estrés oxidativo.

Para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la patología de la T2D y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento, decidimos estudiar también en mayor profundidad cómo las propiedades antioxidantes de otro compuesto dirigido a la mitocondria, como es el SS-31 de la familia de péptidos Szeto-Schiller, afectan al comportamiento de los leucocitos de los pacientes con T2D. SS-31 es un pequeño tetrapéptido soluble en agua y permeable a las células que se une mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas

específicamente a la cardiolipina, un fosfolípido esencial que preserva la estructura y la función adecuada de la IMM, concentrándose de manera independiente del $\Delta\Psi_m$ y protegiendo contra la despolarización mitocondrial.³⁷¹ SS-31 es capaz de modular la función mitocondrial eliminando ROS e inhibiendo la transición de la permeabilidad mitocondrial.^{344,372} Estos efectos son debidos al residuo dimetiltirosina contenido en el SS-31 y no son ejercidos por otros péptidos similares, como el SS-20, que carecen de esta estructura.³⁷³ De nuevo, nuestros resultados respaldan la capacidad antioxidante del compuesto dirigido a la mitocondria ya que el tratamiento de leucocitos de pacientes diabéticos, en este caso con SS-31, redujo de forma significativa los elevados niveles de ROS totales y mitocondriales encontrados en estos pacientes en comparación con los controles. También, a través de microscopia de fluorescencia evaluamos el $\Delta\Psi_m$ y GSH, observando en ambos casos un incremento significativo de sus niveles en los leucocitos de pacientes diabéticos tras el tratamiento con el compuesto peptídico SS-31, permitiendo en la población diabética cierta recuperación hacia los valores presentados por el grupo control. Sin embargo, en ninguno de los parámetros evaluados se registraron cambios significativos con el compuesto control SS-20 en leucocitos de sujetos diabéticos ni sanos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en los que se ha encontrado que el antioxidante SS-31 protege a las células de la toxicidad mitocondrial en modelos animales de enfermedades humanas, incluida la lesión cerebral isquémica²⁹⁹ y el infarto de miocardio.³³⁸

El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son características comunes tanto en los tejidos metabólicos y como en los del sistema cardiovascular de pacientes con T2D^{374,375} y se sabe además que una disminución de la expresión de GPX1 puede conducir a la activación inflamatoria de las células endoteliales, favoreciendo un fenotipo endotelial proaterogénico.³⁷⁶ En cuanto a la relación de éstos con la disfunción endotelial, se sabe que, en condiciones de hiperglucemia, la producción de radicales libres contribuye a la adhesión leucocitaria a través del desacoplamiento de la eNOS, así como la formación de peroxinitrito en las células endoteliales y en los leucocitos, disminuyendo la biodisponibilidad de NO.³⁷⁷⁻³⁷⁹ De hecho, se sabe que los pacientes diabéticos muestran una alteración en la capacidad oxidativa mitocondrial relacionada con la aparición de problemas cardíacos^{475,380} y que, concretamente, en la T2D el daño en la capacidad contráctil del músculo cardíaco ocurre a nivel del complejo mitocondrial I.³⁸¹ En nuestros trabajos hemos observado que el tratamiento con ambos antioxidantes mitocondriales estudiados, MitoQ y SS-31, los cuales son capaces de modular el estrés oxidativo en leucocitos de pacientes diabéticos, también logran modular significativamente las interacciones leucocito-endotelio de estos pacientes aumentando la

velocidad de rodamiento de los leucocitos y disminuyendo el flujo de rodamiento y adhesión de leucocitos sobre el endotelio. Estos resultados evidencian el papel clave que el estrés oxidativo ejerce sobre el endotelio durante la T2D y, sugieren que la suplementación con estos antioxidantes mitocondriales podría suponer una estrategia para modular y aliviar las complicaciones vasculares asociadas a la T2D.

En la literatura se refleja que la deficiencia experimental de GPX1 amplifica ciertos aspectos del envejecimiento, como la disfunción endotelial, la remodelación vascular y la invasión de leucocitos en el tejido cardiovascular. Por ejemplo, Oelze y colaboradores han demostrado que en ratones GPX1 (-/-) existe una elevada producción de ROS que desregula la eNOS e incrementa la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales en cultivo.⁴⁸² Una vez conocida la importancia del estrés oxidativo sobre la función mitocondrial en leucocitos de pacientes con T2D y la interacción de éstos con el endotelio y, dado el posible papel que pueden desempeñar los antioxidantes dirigidos a la mitocondria sobre la función vascular modulando la producción de ROS, así como los niveles de enzimas antioxidantes como la GPX1, el $\Delta\Psi_m$ y las interacciones leucocito-endotelio, también nuestro estudio sugiere que bajo condiciones de estrés oxidativo se induce la activación de NF κ B, promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias. Así pues, hemos evaluado mediante western blot los niveles de expresión proteica de NF κ B y TNF α , observando una correlación positiva entre los niveles de NF κ B y glucosa, lo cual confirma que la hiperglucemia está estrechamente asociada con la inflamación; y, en este sentido, un estudio previo realizado en ratones obesos, ha demostrado que la inhibición de la vía I κ B/NF κ B mejora la tolerancia a la glucosa, señalando el papel central que esta vía de señalización juega en el desarrollo de la T2D.⁴⁸³ Además, los niveles elevados de NF κ B y TNF α presentes en leucocitos de pacientes diabéticos se redujeron significativamente tras el tratamiento con ambos antioxidantes mitocondriales estudiados, MitoQ y SS-31. En relación con estos resultados, se ha demostrado en modelos celulares de glucolipototoxicidad que, los antioxidantes mitocondriales como MitoTempol y MitoQ pueden proteger a las células β pancreáticas frente al estrés oxidativo asociado a la T2D, disminuyendo la actividad NF κ B, promoviendo su supervivencia y aumentando la secreción de insulina.²⁸⁵ Otros estudios han mostrado que el tratamiento con SS-31 previene la degradación de I κ B y, por lo tanto, inhibe la actividad de NF κ B en la inflamación inducida por TNF α en los miotubos C2C12.³⁸⁴ Además, Hao y colaboradores demostraron que SS-31 inhibe la inflamación inducida por las LDL oxidadas sobre los macrófagos reduciendo la expresión proteica de IL-6 y TNF α .³⁸⁵ Nuestros resultados también muestran una asociación negativa entre NF κ B y GPX1, lo cual está de acuerdo con los resultados

descritos previamente en aortas de ratón.³⁸⁶ Curiosamente, en nuestro estudio hemos constatado que, tanto los niveles de NFκB como de TNFα, se correlacionan positivamente con el flujo de rodamiento de los leucocitos, destacando el papel clave de estos marcadores inflamatorios en el proceso aterosclerótico. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se demuestra que el estrés oxidativo presente en las células circulantes, como los leucocitos o las plaquetas, genera un fenotipo proinflamatorio y protrombogénico en el sistema vascular³⁸⁷ y, por tanto, nuestros estudios revelan un posible papel protector de los antioxidantes mitocondriales sobre la vasculatura.

Existen evidencias de que la señalización de NFκB también puede controlar los cambios metabólicos y el equilibrio energético general en coordinación con SIRT1, un importante regulador del metabolismo energético y la supervivencia del tejido. SIRT1 percibe los cambios en la disponibilidad de nutrientes y en el ratio NAD⁺/NADH, y responde a ellos reprogramando las rutas metabólicas, inmunitarias y bioenergéticas, por ejemplo, en el hígado controla la vía gluconeogénica/glucolítica a través del coactivador transcripcional PGC-1α. En la T2D, el ratio NAD⁺/NADH se encuentra altamente alterado dado que, por un lado, el NADH se produce en exceso debido a la influencia de la hiperglucemia en vías generadoras de NADH (glucólisis, ciclo de Krebs y vía del poliol) y, por otro lado, el NAD⁺ se agota debido a la sobreactivación de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP, del inglés poly ADP-ribose polymerases) y el deterioro de las enzimas de regeneración como la lactato deshidrogenasa en eritrocitos y el complejo I en las mitocondrias. En este contexto, se ha demostrado que la disminución de la actividad de esta enzima en ratones está asociada con el desarrollo acelerado de alteraciones metabólicas.³⁸⁸ Estos hechos explicarían, al menos en parte, el descenso en la expresión de SIRT1 que hemos observado en los leucocitos de los pacientes con T2D con respecto a los sujetos sanos. En línea con nuestros hallazgos, Kreutzenberg y colaboradores observaron una reducida expresión de SIRT1 en macrófagos de pacientes con síndrome metabólico que relacionaron con una alterada sensibilidad a la insulina y la formación de placas ateroscleróticas.³⁸⁹ SIRT1 interactúa físicamente con NFκB y media su degradación, ejerciendo así propiedades antiinflamatorias. De hecho, la estimulación de SIRT1 en las células inmunitarias condujo a la inhibición de las vías proinflamatorias y mejoró la sensibilidad a la insulina.³⁹⁰ Las vías de señalización de NFκB y SIRT1 son mecanismos conservados evolutivamente en el mantenimiento de la homeostasis celular, lo que significa que interactúan para integrar el metabolismo energético en la respuesta inmune y parece que esta regulación se encuentra alterada en muchas enfermedades crónicas como la obesidad, la T2D y la aterosclerosis.³⁹¹⁻³⁹⁴ La señalización de NFκB tiene un papel importante en la defensa de la inmunidad innata, mientras que SIRT1 regula la respiración

oxidativa y la supervivencia celular. Sin embargo, la señalización de NFκB puede estimular el flujo de energía glucolítica durante la inflamación aguda, mientras que la activación de SIRT1 inhibe la señalización de NFκB y mejora el metabolismo oxidativo y la resolución de la inflamación. SIRT1 inhibe la señalización de NFκB directamente mediante la desacetilación de la subunidad p65 del complejo NFκB. SIRT1 estimula la producción de energía oxidativa a través de la activación de AMPK, PPARα y PGC-1α y, simultáneamente, estos factores inhiben la señalización de NFκB y suprimen la inflamación. Por otro lado, la señalización de NFκB regula a la baja la actividad de SIRT1 a través de la expresión de las especies miR-34a, IFNγ y ROS. La inhibición de SIRT1 altera el metabolismo de la energía oxidativa y estimula las respuestas inflamatorias inducidas por NFκB presentes en muchas enfermedades metabólicas crónicas y relacionadas con la edad.³⁹⁵ La acción antagonista de NFκB y SIRT1 es crucial para la supervivencia celular, ya que la capacidad de responder rápidamente a patógenos y al daño tisular requiere cambios rápidos en la producción de energía pero, por otro lado, la respuesta inflamatoria aguda debe resolverse cuando desaparece la amenaza si no, podría darse una inflamación crónica perjudicial, como se observa en muchas enfermedades metabólicas. En asociación con una disminución en la señalización de NFκB, la producción de ROS y las interacciones leucocito-endotelio, los resultados presentados revelan una regulación positiva de SIRT1 en leucocitos de pacientes diabéticos tratados con el antioxidante mitocondrial SS-31. Además, nuestro grupo de investigación ha publicado previamente hallazgos similares en leucocitos de pacientes obesos, incluidos en un estudio de intervención dietética, tras la pérdida de peso.³⁹⁶ De hecho, parece que los inhibidores de la señalización de NFκB y los activadores de SIRT1 son agentes terapéuticos potentes tanto en enfermedades inflamatorias como metabólicas debido a la regulación antagónica de estas vías de señalización. En conjunto, los hallazgos descritos sugieren una mejora del estrés oxidativo y la función vascular de los pacientes tratados con antioxidantes mitocondriales, y ponen de manifiesto un efecto protector de estos compuestos en las primeras etapas del proceso aterosclerótico cuando los leucocitos son reclutados hacia las paredes de los vasos sanguíneos.

En la realización de este trabajo en el cual se lleva a cabo un estudio a nivel molecular de la T2D, consideramos que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que induzcan una mejora en la funcionalidad de las células β pancreáticas sería esencial para el tratamiento de esta enfermedad ya que durante su inicio, la homeostasis de la glucosa se altera debido al deterioro de la respuesta compensatoria de las células β,³⁹⁷ lo cual está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial ya que el aumento en los niveles de ROS en las

células β pancreáticas bajo hiperlipidemia e hiperglucemia es uno de los eventos clave que conducen al deterioro de la función β pancreática.³⁹⁸

De hecho, para proceder a evaluar el alcance de los efectos potencialmente beneficiosos del antioxidante mitocondrial MitoQ en esta dirección, empleamos la línea de células β pancreáticas INS-1E, que reproduce estrechamente la función de los islotes pancreáticos y tiene alta capacidad de respuesta estable a la glucosa siendo de gran utilidad para estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la secreción de insulina. En condiciones normales, las células β pancreáticas generan ATP al metabolizar la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo Krebs. Además, las células β regulan la glucemia mediante la liberación de insulina, lo que ocurre cuando el metabolismo de la glucosa en las células β aumenta la relación ATP/ADP y conlleva el desplazamiento de Ca^{2+} , que a su vez provoca la liberación de insulina. Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman que bajo condiciones de hiperglucemia, las células β pancreáticas presentan un aumento en la producción de ROS, tanto mitocondriales como totales, un descenso en los niveles intracelulares de GSH y un incremento en la tasa de consumo de O_2 mitocondrial, lo que apunta a una alteración de la función mitocondrial y nos lleva a plantear la hipótesis de que el tratamiento dirigido a este orgánulo podría tener potencial efectividad terapéutica protegiendo eficazmente contra el daño oxidativo desde su origen. Las células β pancreáticas son particularmente susceptibles al daño por ROS debido a su reducida expresión de enzimas antioxidantes³⁹⁹ y, en relación con esto, los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con MitoQ reduce significativamente el consumo de O_2 mitocondrial en condiciones de hiperglucemia, así como la producción de ROS totales y mitocondriales, y modula el contenido intracelular de GSH, por lo que ejerce un efecto antioxidante. Además, la administración de MitoQ a células β pancreáticas bajo elevadas concentraciones de glucosa, incrementa de forma significativa la secreción de insulina, lo que sugiere una mejora de su funcionalidad. Estos resultados están en línea con nuestros resultados en leucocitos de pacientes con T2D y estudios previos que muestran que MitoQ reduce los ROS y mejora las actividades antioxidantes como la GPX1 en condiciones de estrés oxidativo en fibroblastos derivados de pacientes con acidemia propiónica.⁴⁰⁰

Junto al estrés oxidativo, entre los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la T2D se encuentra el estrés de ER, que parece jugar un papel fundamental en la inhibición de la acción de la insulina en tejidos periféricos^{120,401} y en la disfunción de las células β pancreáticas.¹³⁵ Sin embargo, la manera en que se regula la respuesta al estrés ER, conocida como UPR, no se conoce en profundidad al igual que tampoco se sabe cómo el control glucémico podría estar

afectando a esta señalización. Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de GRP78 en células β pancreáticas están aumentados bajo condiciones de hiperglucemia, confirmando un aumento del estrés de ER asociado al desarrollo de la T2D. Tras la inducción de la UPR, la producción de la chaperona molecular GRP78 aumenta drásticamente como un mecanismo para incrementar la capacidad de plegamiento del ER.^{107,402} Además, bajo estas condiciones de hiperglucemia también observamos elevados niveles de P-eIF2 α indicando una activación de la ruta de PERK para atenuar la traducción de proteínas. Curiosamente, la evaluación de dichos parámetros tras el tratamiento de las células β con el antioxidante mitocondrial MitoQ, mostró una significativa reducción en la expresión de GRP78 y del principal mediador de la ruta PERK, sugiriendo que el tratamiento podría modular esta respuesta adaptativa que se activa bajo el daño oxidativo al que conlleva la condición de hiperglucemia que caracteriza a la T2D. En consonancia con estos hallazgos, las alteraciones observadas en el almacenamiento de Ca²⁺ intracelular en respuesta a los niveles elevados de glucosa también fueron restauradas por el MitoQ. En situaciones de estrés crónico se produce un bombeo excesivo de Ca²⁺ desde el ER hacia la mitocondria, donde puede incrementar el $\Delta\Psi_m$, la producción de ROS e inducir disfunción mitocondrial. A su vez estos ROS mitocondriales, al ser transferidos al lumen del ER, pueden interferir en el adecuado plegamiento de proteínas cronificando la situación de estrés. Si este mecanismo de retroalimentación se prolonga, ambos orgánulos inician rutas de apoptosis conjuntas que pueden conducir a la muerte celular. Nuestros resultados sugieren que la suplementación con MitoQ podría estar mejorando la homeostasis celular y la funcionalidad del ER y la mitocondria, puesto que un descenso de los marcadores de estrés de ER se acompañó de un descenso de los niveles de Ca²⁺ y producción de ROS mitocondriales. Además, como bien se ha mencionado anteriormente, las tres rutas de la UPR están ligadas a la señalización inflamatoria a través de la activación de NF κ B¹¹³ y el tratamiento de las células INS-1E con el antioxidante mitocondrial MitoQ redujo, de forma notable, la elevada expresión del factor proinflamatorio NF κ B en condiciones de hiperglucemia. 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 pancreáticas.¹⁶¹ Por ejemplo, se sabe que 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 FAS¹⁶⁵. Además, estudios previos han demostrado que la intolerancia a la glucosa en ratones obesos se atenúa después de la inhibición de la vía I κ B/NF κ B³⁸³, lo que sugiere que esta vía de señalización es también un factor central en el desarrollo de la diabetes y, por ello, se sugiere el tratamiento con MitoQ como una opción para la prevención y/o tratamiento de la IR y, por lo

tanto, de la T2D. En base a éstas y otras evidencias previas, el estrés de ER se postula como una posible diana terapéutica relevante dentro de la fisiopatología de la T2D, puesto que se asocia con la mejora de otras respuestas al estrés celular y alteraciones metabólicas como la IR y la inflamación sistémica. De hecho, el uso de chaperonas químicas como TUDCA y 4-PBA para facilitar el plegamiento de proteínas ha sido ampliamente estudiado en tejidos metabólicos como el adiposo o el hepático, donde reducen el estrés de ER y la señalización inflamatoria.

Recientemente, nuestro grupo ha descrito la presencia de estrés ER en leucocitos de pacientes con T2D en comparación a sujetos control, sin embargo, el patrón de activación de la señalización UPR no se manifiesta por igual en todos los pacientes. Curiosamente, los resultados obtenidos en estos estudios previos sugieren que la T2D estimula una respuesta adaptativa al estrés de ER cuando existe un buen control glucémico, con niveles elevados de GRP78 y activándose la ruta sXBP1 mientras que, bajo un alterado metabolismo de la glucosa se manifiesta de forma crónica, activando el factor proapoptótico CHOP.¹³⁸

El mantenimiento de un equilibrio redox en el ER parece ser fundamental para el correcto plegamiento de las proteínas.^{403,404} Durante el proceso de plegamiento, se produce un aumento en la producción de ROS como resultado de la formación de puentes disulfuro, catalizada por enzimas oxidoreductasas que utilizan O₂ como aceptor final de electrones. Esta producción de ROS se intensifica cuando hay un aumento de proteínas mal plegadas que necesitan de la acción de estas chaperonas.¹¹⁵ Sin embargo, otros estudios han observado en células β pancreáticas que el estrés oxidativo es responsable de la activación de marcadores de estrés de ER inducida por LDL oxidadas, indicando que la relación del estrés de ER y estrés oxidativo es bidireccional.⁴⁰⁵ Además, la presencia de unos niveles adecuados de GSH es crucial ya que pueden replegar correctamente las proteínas mal plegadas al reaccionar y reducir los puentes disulfuro no nativos.⁴⁰⁶ 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 ER. En la presente tesis hemos demostrado que los leucocitos de pacientes con T2D presentan un incremento en la producción de ROS y un descenso en los niveles intracelulares de GSH, eventos que fueron regulados tras la administración de los antioxidantes mitocondriales en estudio, lo que nos lleva a plantearnos para futuras investigaciones si la administración de estos compuestos tendría algún efecto sobre el patrón de activación de la UPR que se han observado en estudios previos en pacientes con T2D.

Además, una de las consecuencias principales en el curso habitual de la UPR es la activación del proceso autofágico inducido por estrés de ER como mecanismo adaptativo al estrés celular,⁴⁰⁷

y en este sentido, González y colaboradores, han descrito que la escisión y la lipidación de la proteína asociada a microtúbulos (LC3, del inglés *microtubule-associated protein light chain 3*) I en LC3 II está mediada por la fosforilación de PERK/eIF2 α .⁴⁰⁸ Del mismo modo, la activación de la autofagia también puede regularse a través del estrés oxidativo, siendo por ejemplo el radical O₂^{•-} un inductor del proceso.⁴⁰⁹ La fisiopatología de la T2D caracterizada por la IR, se ha relacionado con alteraciones en el proceso autofágico,^{408,410} algo que no es de extrañar puesto que en las células β pancreáticas, la autofagia mantiene el equilibrio entre la demanda, síntesis y liberación de insulina en respuesta a los niveles de glucosa. La autofagia también tiene un papel clave en la prevención del estrés oxidativo y señalización proinflamatoria, pues a través del proceso denominado mitofagia, recicla las mitocondrias defectuosas.⁴¹¹ De hecho, los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo demuestran que en comparación con sujetos control, existe un claro aumento en la expresión de marcadores de autofagia en pacientes con T2D.^{412,413} Nuestros estudios previos indican además, que la elevada expresión en leucocitos de pacientes diabéticos de los marcadores Beclina 1 (BECN1, del inglés *beclin 1*) y LC3 II/I – que participan en la formación del autofagosoma^{414,415}– se correlaciona positivamente con los marcadores de estrés de ER estudiados.⁴¹⁶ Así mismo, hay una correlación entre BECN1 y la producción de ROS, indicando que el estrés oxidativo y la autofagia ocurren de forma simultánea.⁴¹⁶ Estos resultados indican que todo 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 es incapaz por sí sola de reducir el estrés de ER y promover una respuesta antioxidante), por lo que también planteamos como hipótesis de próximos estudios si existe alguna conexión y/o interferencia en la regulación de estos procesos en leucocitos de pacientes con T2D mediante el tratamiento con los antioxidantes dirigidos a la mitocondria evaluados a lo largo de esta tesis. Concretamente en este tipo celular, el mantenimiento de unos niveles óptimos de autofagia es muy importante, puesto que participa en funciones clave como la regulación en la producción de citoquinas proinflamatorias o la eliminación de patógenos.⁴¹⁶

En resumen, gracias a los avances realizados en biomedicina, se ha conseguido el reconocimiento de la mitocondria como elemento clave en distintas áreas de la ciencia biomédica. Los resultados de la presente tesis doctoral sugieren que el estudio de moléculas, tales como MitoQ y SS-31, dirigidos específicamente a este orgánulo para modular un mecanismo tan fundamental como es el estrés oxidativo, permitirá un mejor abordaje terapéutico de la T2D a través de posibles efectos beneficiosos en numerosos aspectos

fisiopatológicos que mediante la reducción del daño oxidativo podrían mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes. En conjunto, nuestras evidencias aportan un mayor conocimiento acerca de los mecanismos moleculares por los que los tratamientos con estos antioxidantes mitocondriales podrían mejorar la función vascular de los pacientes con T2D 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.

En base a todo lo anteriormente comentado en esta tesis, concluimos que, en el tratamiento de la T2D, el objetivo de una potencial terapia incluye, no sólo la mejora de la homeostasis de la glucosa, sino también la modulación del estrés celular y de la función mitocondrial en tejidos metabólicos, con el objetivo de mejorar la función β pancreática y atenuar la IR y la inflamación, pudiéndose evitar el desarrollo de complicaciones macro- y microvasculares. En conjunto, los resultados de la presente tesis doctoral muestran una implicación del estrés oxidativo, la disfunción endotelial y el estrés de ER en la T2D; e indican que estos mecanismos moleculares conforman un complejo puzzle de fichas interconectadas que sientan las bases fisiopatológicas de esta enfermedad y las complicaciones asociadas.

4. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de leucocitos de pacientes con T2D con el antioxidante dirigido a la mitocondria MitoQ modula diversos mecanismos proaterogénicos como la señalización inflamatoria, el estrés oxidativo y las interacciones leucocito-endotelio. En este contexto, se reduce la adherencia de los leucocitos a las células del endotelio vascular, lo que sugiere un papel protector en las etapas tempranas del proceso aterosclerótico.
2. Los leucocitos de pacientes con T2D tratados con el antioxidante mitocondrial SS-31 presentan una reducción de los marcadores de estrés oxidativo, que se asocia a una disminución de las interacciones leucocito-endotelio. Por lo tanto, el papel protector de este antioxidante dirigido a la mitocondria sobre las complicaciones vasculares podría estar mediado, en parte, a través de estos mecanismos.
3. El tratamiento de las células INS-1E con el antioxidante MitoQ modula la secreción de insulina, la función mitocondrial, el estrés del ER y la vía de señalización inflamatoria de NFκB bajo elevada concentración de glucosa, lo que sugiere que este compuesto ejerce efectos beneficiosos sobre la función de las células β pancreáticas. En consecuencia, las señales de estrés entre la mitocondria y el ER – Ca²⁺ y ROS – se reducen, mejorando de esta manera la homeostasis celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Nathan, D.M.; Turgeon, H.; and Regan, S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia*. **2007**, *50*, 2239-2244.
- 2 American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. **2018**, *41*, S13-S27.
- 3 Cho, N.H.; Shaw, J.E.; Karuranga, S.; Huang, Y.; da Rocha Fernandes, J.D.; Ohlrogge, A.W.; and Malanda, B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2018**, *138*, 271-281.
- 4 Chatterjee, S., Khunti, K., and Davies, M.J. Type 2 diabetes. *Lancet*. **2017**, *389*, 2239-2251.
- 5 International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas (6th edition). Brussels (Belgium): International Diabetes Federation. **2013**. <http://www.idf.org/diabetesatlas>
- 6 GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. 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*. **2016**, *388*, 1545-1602.
- 7 Roder, P.V.; Wu, B.; Liu, Y.; and Han, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **2016**, *48*, e219.
- 8 Boucher, J.; Kleinridders, A.; and Kahn, C.R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2014**, *6*, 10.1101/cshperspect.a009191.
- 9 Cho, H.; Mu, J.; Kim, J.K.; Thorvaldsen, J.L.; Chu, Q.; Crenshaw, E.B.; Kaestner, K.H.; Bartolomei, M.S.; Shulman, G.I.; and Birnbaum, M.J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. **2001**, *292*, 1728-1731.
- 10 Koumanov, F.; Jin, B.; Yang, J.; and Holman, G.D. Insulin signaling meets vesicle traffic of GLUT4 at a plasma-membrane-activated fusion step. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 179-189.
- 11 Summers, S.A.; Kao, A.W.; Kohn, A.D.; Backus, G.S.; Roth, R.A.; Pessin, J.E.; and Birnbaum, M.J. The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17934-17940.
- 12 Proud, C.G.; Wang, X.; Patel, J.V.; Campbell, L.E.; Kleijn, M.; Li, W.; and Browne, G.J. Interplay between insulin and nutrients in the regulation of translation factors. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 541-547.
- 13 Kitamura, T.; Kitamura, Y.; Kuroda, S.; Hino, Y.; Ando, M.; Kotani, K.; Konishi, H.; Matsuzaki, H.; Kikkawa, U.; Ogawa, W.; and Kasuga, M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6286-6296.

- ¹⁴ 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.* Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2015**, *1*, 15019.
- ¹⁵ Carnagarin, R.; Dharmarajan, A.M.; and Dass, C.R. Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle: A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *417*, 52-62.
- ¹⁶ DeFronzo, R.A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* **2004**, *143*, 9-21.
- ¹⁷ Samuel, V.T.; and Shulman, G.I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 12-22.
- ¹⁸ Poitout, V.; Amyot, J.; Semache, M.; Zarrouki, B.; Hagman, D.; and Fontés, G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1801*, 289-298.
- ¹⁹ Shah, P.; Vella, A.; Basu, A.; Basu, R.; Schwenk, W.F.; and Rizza, R.A. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 4053-g.
- ²⁰ Dinneen, S.; Alzaid, A.; Turk, D.; and Rizza, R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia.* **1995**, *38*, 337-343.
- ²¹ Cornier, M.A.; Marshall, J.A.; Hill, J.O.; Maahs, D.M.; and Eckel, R.H. Prevention of overweight/obesity as a strategy to optimize cardiovascular health. *Circulation.* **2011**, *124*, 840-850.
- ²² Javed, A.; Jumean, M.; Murad, M.H.; Okorodudu, D.; Kumar, S.; Somers, V.K.; Sochor, O.; and Lopez-Jimenez, F. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric Obesity.* **2015**, *10*, 234-244.
- ²³ 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.* Prevention, diagnosis, and treatment of obesity. 2016 position statement of the Spanish Society for the Study of Obesity. *Endocrinol. Diabetes Nutr.* **2017**, *64*, 15-22.
- ²⁴ Hu, F.B.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.; Liu, S.; Solomon, C.G.; and Willett, W.C. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 790-797.
- ²⁵ Blundell, J.E.; Dulloo, A.G.; Salvador, J.; Frühbeck, G.; and EASO SAB Working Group on BMI. Beyond BMI: Phenotyping the Obesities. *Obes. Facts.* **2014**, *7*, 322-328.

- ²⁶ 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. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *145*, 614-619.
- ²⁷ Pischon, N.; Heng, N.; Bernimoulin, J.P.; Kleber, B.M.; Willich, S.N.; and Pischon, T. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 400-409.
- ²⁸ Després, J.P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation.* **2012**, *126*, 1301-1313.
- ²⁹ Grundy, S.M.; Cleeman, J.I.; Daniels, S.R.; Donato, K.A.; Eckel, R.H.; Franklin, B.A.; Gordon, D.J.; Krauss, R.M.; Savage, P.J.; Smith, S.C.; *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific statement. *Circulation.* **2005**, *112*, 2735-2752.
- ³⁰ Sears, B.; and Perry, M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health. Dis.* **2015**, *14*, 121-015-0123-1.
- ³¹ Greene, M.W.; Sakaue, H.; Wang, L.; Alessi, D.R.; and Roth, R.A. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8199-8211.
- ³² Coelho, M.; Oliveira, T.; and Fernandes, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* **2013**, *9*, 191-200.
- ³³ Scherer, P.E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* **2006**, *55*, 1537-1545.
- ³⁴ Petrie, J.R.; Guzik, T.J.; and Touyz, R.M. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can. J. Cardiol.* **2018**, *34*, 575-584.
- ³⁵ 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. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ.* **2000**, *321*, 412-419.
- ³⁶ Pavlou, D.I.; Paschou, S.A.; Anagnostis, P.; Spartalis, M.; Spartalis, E.; Vryonidou, A.; Tentolouris, N.; and Siasos, G. Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. *Maturitas.* **2018**, *112*, 71-77.
- ³⁷ Szalat, A.; Durst, R.; and Leitersdorf, E. Managing dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *30*, 431-444.
- ³⁸ Haas, M.E.; Attie, A.D.; and Biddinger, S.B. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 391-397.

- ³⁹ Choi, S.H.; and Ginsberg, H.N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 353-363.
- ⁴⁰ 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.* Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1345-1352.
- ⁴¹ Turner, R.C.; Millns, H.; Neil, H.A.; Stratton, I.M.; Manley, S.E.; Matthews, D.R.; and Holman, R.R. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ.* **1998**, *316*, 823-828.
- ⁴² Malave, H.; Castro, M.; Burkle, J.; Voros, S.; Dayspring, T.; Honigberg, R.; and Pourfarzib, R. 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.* **2012**, *110*, 662-665.
- ⁴³ Varughese, G.I.; Tomson, J.; and Lip, G.Y. Type 2 diabetes mellitus: a cardiovascular perspective. *Int. J. Clin. Pract.* **2005**, *59*, 798-816.
- ⁴⁴ Navarese, E.P.; Kolodziejczak, M.; Schulze, V.; Gurbel, P.A.; Tantry, U.; Lin, Y.; Brockmeyer, M.; Kandzari, D.E.; Kubica, J.M.; D'Agostino, R.B.; *et al.* Effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibodies in adults with hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **2015**, *163*, 40-51.
- ⁴⁵ Schmidt, A.F.; Swerdlow, D.I.; Holmes, M.V.; Patel, R.S.; Fairhurst-Hunter, Z.; Lyall, D.M.; Hartwig, F.P.; Horta, B.L.; Hyppönen, E.; Power, C.; *et al.* PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2016**, *5*, 97-105.
- ⁴⁶ Sabatine, M.S.; Giugliano, R.P.; Keech, A.C.; Honarpour, N.; Wiviott, S.D.; Murphy, S.A.; Kuder, J.F.; Wang, H.; Liu, T.; Wasserman, S.M.; *et al.* (2017). Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1713-1722.
- ⁴⁷ Giugliano, R.P.; Mach, F.; Zavitz, K.; Kurtz, C.; Schneider, J.; Wang, H.; Keech, A.; Pedersen, T.R.; Sabatine, M.S.; Sever, P.S.; *et al.* EBBINGHAUS trial: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to assess the effect of evolocumab on cognitive function in patients with clinically evident cardiovascular disease and receiving statin background lipid-lowering therapy-A cognitive study of patients enrolled in the FOURIER trial. *Clin. Cardiol.* **2017**, *40*, 59-65.
- ⁴⁸ Vasavada, N.; and Agarwal, R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* **2005**, *12*, 146-154.
- ⁴⁹ Baynes, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* **1991**, *40*, 405-412.

- ⁵⁰ Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- ⁵¹ Emelyanov, V.V. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1599-1618.
- ⁵² Balaban, R.S.; Nemoto, S.; and Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* **2005**, *120*, 483-495.
- ⁵³ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 401.
- ⁵⁴ Hadj-Moussa, H.; Green, S.R.; and Storey, K.B. The Living Dead: Mitochondria and Metabolic Arrest. *IUBMB Life.* **2018**, *70*, 1260-1266.
- ⁵⁵ Newmeyer, D.D.; Farschon, D.M.; and Reed, J.C. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell.* **1994**, *79*, 353-364.
- ⁵⁶ Jordán, J.; Ceña, V.; and Prehn, J.H. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J. Physiol. Biochem.* **2003**, *59*, 129-141.
- ⁵⁷ McBride, H.M.; Neuspiel, M.; and Wasiak, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, R551-560.
- ⁵⁸ Wallace, D.C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 781-821.
- ⁵⁹ Fukai, T.; and Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1583-1606.
- ⁶⁰ Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1830*, 3217-3266.
- ⁶¹ Chartoumpakis, D.V.; and Kensler, T.W. 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.* **2013**, *9*, 137-145.
- ⁶² Bause, A.S.; and Haigis, M.C. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **2013**, *48*, 634-639.
- ⁶³ Tang, B.L. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol. Cells.* **2016**, *39*, 87-95.
- ⁶⁴ Webster, B.R.; Scott, I.; Traba, J.; Han K.; and Sack, M.N. Regulation of autophagy and mitophagy by nutrient availability and acetylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1841*, 525-534.

- ⁶⁵ Yaribeygi, H., Atkin, S.L., and Sahebkar, A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 1300-1312.
- ⁶⁶ Bloomgarden, Z.T. Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care.* **2005**, *28*, 745-751.
- ⁶⁷ Jain, S.K.; McVie, R.; Duett, J.; and Herbst, J.J. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes.* **1989**, *38*, 1539-1543.
- ⁶⁸ Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.A.; Beebe, D.; Oates, P.J.; Hammes, H.P.; Giardino, I.; and Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* **2000**, *404*, 787-790.
- ⁶⁹ Marfella, R.; Quagliaro, L.; Nappo, F.; Ceriello, A.; and Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 635-636.
- ⁷⁰ 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. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem. J.* **2009**, *423*, 253-264.
- ⁷¹ Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* **2001**, *414*, 813-820.
- ⁷² Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* **2005**, *54*, 1615-1625.
- ⁷³ Hyndman, D.; Bauman, D.R.; Heredia, V.V.; and Penning, T.M. The aldo-Keto reductase superfamily homepage. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *143-144*, 621-631.
- ⁷⁴ Chung, S.S.; Ho, E.C.; Lam, K.S.; and Chung, S.K. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, *14*, S233-236
- ⁷⁵ Goldberg, H.; Whiteside, C.; and Fantus, I.G. O-linked beta-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2011**, *301*, E713-26.
- ⁷⁶ Rajapakse, A.G.; Ming, X.F.; Carvas, J.M.; and Yang, Z. O-linked beta-N-acetylglucosamine during hyperglycemia exerts both anti-inflammatory and pro-oxidative properties in the endothelial system. *Oxid Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 172-175.
- ⁷⁷ McLarty, J.L.; Marsh, S.A.; and Chatham, J.C. Post-translational protein modification by O-linked N-acetyl-glucosamine: its role in mediating the adverse effects of diabetes on the heart. *Life Sci.* **2013**, *92*, 621-627.
- ⁷⁸ Schleicher, E.D.; and Weigert, C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* **2000**, *77*, S13-8.

- ⁷⁹ Fleming, I.; and Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2003**, *284*, R1-12.
- ⁸⁰ 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. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes*. **2000**, *49*, 1239-1248.
- ⁸¹ Xu, H.; Czerwinski, P.; Hortmann, M.; Sohn, H.Y.; Forstermann, U.; and Li, H. Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc. Res.* **2008**, *78*, 349-355.
- ⁸² Inoguchi, T.; Li, P.; Umeda, F.; Yu, H.Y.; Kakimoto, M.; Imamura, M.; Aoki, T.; Etoh, T.; Hashimoto, T.; Naruse, M.; Sano, H.; Utsumi, H.; and Nawata, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through Protein Kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. **2000**, *49*, 1939-1945.
- ⁸³ Beckman, J.A. Inhibition of protein kinase C beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circulation Research*. **2001**, *90*, 107-111.
- ⁸⁴ Saijo, K.; Mecklenbrauker, I.; Santana, A.; Leitger, M.; Schmedt, C.; and Tarakhovsky, A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 1647-1652.
- ⁸⁵ Degenhardt, T.P.; Thorpe, S.R.; and Baynes, J.W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)*. **1998**, *44*, 1139-1145.
- ⁸⁶ Uribarri, J.; Cai, W.; Sandu, O.; Peppia, M.; Goldberg, T.; and Vlassara, H. 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.* **2005**, *1043*, 461-466.
- ⁸⁷ Coughlan, M.T.; Thorburn, D.R.; Penfold, S.A.; Laskowski, A.; Harcourt, B.E.; Sourris, K.C.; Tan, A.L.; Fukami, K.; Thallas-Bonke, V.; Nawroth, P.P.; *et al.* RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 742-752.
- ⁸⁸ Wautier, M.P.; Chappey, O.; Corda, S.; Stern, D.M.; Schmidt, A.M.; and Wautier, J.L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *280*, E685-94.
- ⁸⁹ Flyvberg, A. A putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia*. **2000**, *43*, 1205-1223.
- ⁹⁰ Ahmed, N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2005**, *67*, 3-21.

- ⁹¹ Coughlan, M.T.; Yap, F.Y.; Tong, D.C.; Andrikopoulos, S.; Gasser, A.; Thallas-Bonke, V.; Webster, D.E.; Miyazaki, J.; Kay, T.W.; Slattery, R.M.; *et al.* Advanced glycation end products are direct modulators of β -cell function. *Diabetes*. **2011**, *60*, 2522-2532.
- ⁹² Huebschmann, A.G.; Regensteiner, J.G.; Vlassara, H.; and Reusch, J.E. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. **2006**, *29*, 1420-1432.
- ⁹³ Koska, J.; Saremi, A.; Howell, S.; Bahn, G.; De Courten, B.; Ginsberg, H.; Beisswenger, P.J.; Reaven, P.D.; and VADT Investigators. Advanced Glycation End Products, Oxidation Products, and Incident Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. **2018**, *41*, 570-576.
- ⁹⁴ Madamanchi, N.R.; Vendrov, A.; and Runge, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **2005**, *25*, 29-38.
- ⁹⁵ Kowaltowski, A.J.; and Vercesi, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. **1999**, *26*, 463-471.
- ⁹⁶ Pieczenik, S.R.; and Neustadt, J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp. Mol. Pathol*. **2007**, *83*, 84-92.
- ⁹⁷ Chicco, A.J.; and Sparagna, G.C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. **2007**, *292*, C33-44.
- ⁹⁸ Musatov, A.; and Robinson, N.C. Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic. Res*. **2012**, *46*, 1313-1326.
- ⁹⁹ Schagger, H.; and Pfeiffer, K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem*. **2001**, *276*, 37861-37867.
- ¹⁰⁰ Ozawa, T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. *Biosci. Rep*. **1997**, *17*, 237-250.
- ¹⁰¹ Victor, V.M.; Rocha, M.; Herance, R.; and Hernandez-Mijares, A. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Curr. Pharm. Des*. **2011**, *17*, 3947-3958.
- ¹⁰² Kelley, D.E.; He, J.; Menshikova, E.V.; and Ritov, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. **2002**, *51*, 2944-2950.
- ¹⁰³ Rabøl, R.; Svendsen, P.F.; Skovbro, M.; Boushel, R.; Haugaard, S.B.; Schjerling, P.; Schrauwen, P.; Hesselink, M.K.; Nilas, L.; Madsbad, S.; *et al.* Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in nondiabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss. *Metabolism*. **2009**, *58*, 1145-1152.

- ¹⁰⁴ Holmström, M.H.; Iglesias-Gutierrez, E.; Zierath, J.R.; and Garcia-Roves, P.M. Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**, *302*, E731-739.
- ¹⁰⁵ Patti, M.E.; and Corvera, S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **2010**, *31*, 364-395.
- ¹⁰⁶ Hey-Mogensen, M.; Højlund, K.; Vind, B.F.; Wang, L.; DeLa, F.; Beck-Nielsen, H.; Fernström, M.; and Sahlin, K. Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* **2010**, *53*, 1976-1985.
- ¹⁰⁷ Schroder, M.; and Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 739-789.
- ¹⁰⁸ Higa, A.; and Chevet, E. Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 1548-1555.
- ¹⁰⁹ Klausner, R.D.; and Sitia, R. Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell.* **1990**, *62*, 611-614.
- ¹¹⁰ Hotamisligil, G.S.; and Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews. Immunology.* **2008**, *8*, 923-934.
- ¹¹¹ Kim, I.; Xu, W.; and Reed, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 1013-1030.
- ¹¹² Malhotra, J.D.; and Kaufman, R.J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2007**, *18*, 716-731.
- ¹¹³ Hotamisligil, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* **2010**, *140*, 900-917.
- ¹¹⁴ Hoyer-Hansen, M.; and Jaattela, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1576-1582.
- ¹¹⁵ Haynes, C.M.; Titus, E.A.; and Cooper, A.A. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell.* **2004**, *15*, 767-776.
- ¹¹⁶ Wu, C.C.; and Bratton, S.B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 546-558.
- ¹¹⁷ Ogata, M.; Hino, S.; Saito, A.; Morikawa, K.; Kondo, S.; Kanemoto, S.; Murakami, T.; Taniguchi, M.; Tani, I.; Yoshinaga, K.; *et al.* Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 9220-9231.

- ¹¹⁸ Preston, A.M.; Gurisik, E.; Bartley, C.; Laybutt, D.R.; and Biden, T.J. Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia*. **2009**, *52*, 2369-2373.
- ¹¹⁹ Eizirik, D.L.; Cardozo, A.K.; and Cnop, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 42-61.
- ¹²⁰ 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. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. **2004**, *306*, 457-461.
- ¹²¹ Boden, G.; Duan, X.; Homko, C.; Molina, E.J.; Song, W.; Perez, O.; Cheung, P.; and Merali, S. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes*. **2008**, *57*, 2438-2444.
- ¹²² Kawasaki, N.; Asada, R.; Saito, A.; Kanemoto, S.; and Imaizumi, K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific Reports*. **2012**, *2*, 799.
- ¹²³ 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.; *et al.* Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2011**, *111*, 2015-2023.
- ¹²⁴ Gregor, M.F.; Yang, L.; Fabbrini, E.; Mohammed, B.S.; Eagon, J.C.; Hotamisligil, G.S.; and Klein, S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. **2009**, *58*, 693-700.
- ¹²⁵ Fu, S.; Yang, L.; Li, P.; Hofmann, O.; Dicker, L.; Hide, W.; Lin, X.; Watkins, S.M.; Ivanov, A.R.; and Hotamisligil, G.S. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*. **2011**, *473*, 528-531.
- ¹²⁶ Cnop, M.; Foufelle, F.; and Velloso, L.A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 59-68.
- ¹²⁷ Boden, G.; Cheung P.; Salehi, S.; Homko, C.; Loveland-Jones, C.; Jayarajan, S.; Stein, T.P.; Williams, K.J.; Liu, M.L.; Barrero, C.A.; and Merali, S. Insulin regulates the unfolded protein response in human adipose tissue. *Diabetes*. **2014**, *63*, 912-922.
- ¹²⁸ Mekahli, D.; Bultynck, G.; Parys, J.B.; De Smedt, H.; and Missiaen, L. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004317. [10.1101/cshperspect.a004317](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004317).
- ¹²⁹ Otda, T.; Takamura, T.; Misu, H.; Ota, T.; Murata, S.; Hayashi, H.; Takayama, H.; Kikuchi, A.; Kanamori, T.; Shima, K.R.; *et al.* Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes*. **2013**, *62*, 811-824.

- ¹³⁰ Yang, L.; Li, P.; Fu, S.; Calay, E.S.; and Hotamisligil, G.S. Defective hepatic autophagy in obesity promotes er stress and causes insulin resistance. *Cell. Metabolism*. **2010**, *11*, 467-478.
- ¹³¹ Díaz-Ruiz, A.; Guzmán-Ruiz, R.; Moreno, N.R.; García-Rios, A.; Delgado-Casado, N.; Membrives, A.; Túnez, I.; El Bekay, R.; Fernández-Real, J.M.; Tovar, S.; et al. Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid. Redox Signal*. **2015**, *23*, 597-612.
- ¹³² Seo, J.; Fortunó, E.S.; Suh, J.M.; Stenesen, D.; Tang, W.; Parks, E.J.; Adams, C.M.; Townes, T.; and Graff, J.M. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes*. **2009**, *58*, 2565-2573.
- ¹³³ Chan, S.M.; Sun, R.Q.; Zeng, X.Y.; Choong, Z.H.; Wang, H.; Watt, M.J.; and Ye, J.M. Activation of PPAR α ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*. **2013**, *62*, 2095-2105
- ¹³⁴ 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. Regulation of hepatic gluconeogenesis by an ER-bound transcription factor, CREBH. *Cell. Metab.* **2010**, *11*, 331-339.
- ¹³⁵ Volchuk, A.; and Ron, D. The endoplasmic reticulum stress response in the pancreatic beta-cell. *Diabetes Obes. Metab.* **2010**, *12 Suppl 2*, 48-57.
- ¹³⁶ 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. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 481-490.
- ¹³⁷ 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. Oxidative and endoplasmic reticulum stress is impaired in leukocytes from metabolically unhealthy vs healthy obese individuals. *Int. J. Obes. (Lond)*. **2017**, *41*, 1556-1563.
- ¹³⁸ Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Apostolova, N.; Morillas, C.; Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; and Victor, V.M. Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid. Redox Signal*. **2014**, *21*, 1759-1765.
- ¹³⁹ Panzhinskiy, E.; Hua, Y.; Culver, B.; Ren, J.; and Nair, S. Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes. *Diabetologia*. **2013**, *56*, 598-607.
- ¹⁴⁰ Görlach, A.; Klappa, P.; and Kietzmann, T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signalling, and redox control. *Antiox. Redox Biol.* **2006**, *8*, 1391-1418.
- ¹⁴¹ Cullinan, S.B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvisais, E.; Kaufman, R.J.; and Diehl, J.A. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 7198-7209.

- ¹⁴² 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.* Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell. Metab.* **2012**, *16*, 265-273.
- ¹⁴³ Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H.P.; and Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* **2000**, *287*, 664-666.
- ¹⁴⁴ Lerner, A.G.; Upton, J.P.; Praveen, P.V.; Ghosh, R.; Nakagawa, Y.; Igbaria, A.; Shen, S.; Nguyen, V.; Backes, B.J.; Heiman, M.; *et al.* IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell. Metab.* **2012**, *16*, 250-264.
- ¹⁴⁵ Donath, M.Y.; and Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 98-107.
- ¹⁴⁶ Gray, S.L.; and Vidal-Puig, A.J. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr. Rev.* **2007**, *65*, S7-12
- ¹⁴⁷ Gugliucci, A. Glycation as the glucose link to diabetic complication. *J. Am. Osteopath. Assoc.* **2000**, *100*, 624-634.
- ¹⁴⁸ Surmi, B.K.; and Hasty, A.H. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol.* **2008**, *3*, 545-556.
- ¹⁴⁹ Giulietti, A.; Van Etten, E.; Overbergh, L.; Stoffels, K.; Bouillon, R.; and Mathieu, C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25 Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2007**, *77*, 47-57.
- ¹⁵⁰ Herder, C.; Illig, T.; Rathmann, W.; Martin, S.; Haastert, B.; Muller-Scholze, S.; Holle, R.; Thorand, B.; Koenig, W.; Wichmann, H.E.; *et al.* Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen.* **2005**, *67 Suppl 1*, S115-21.
- ¹⁵¹ Pickup, J.C.; Mattock, M.B.; Chusney, G.D.; and Burt, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* **1997**, *40*, 1286-1292.
- ¹⁵² Spranger, J.; Kroke, A.; Mohlig, M.; Hoffmann, K.; Bergmann, M.M.; Ristow, M.; Boeing, H.; and Pfeiffer, A.F. 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.* **2003**, *52*, 812-817.
- ¹⁵³ Kahn, S.E.; Hull, R.L.; and Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* **2006**, *444*, 840-846.

- ¹⁵⁴ Petersen, K.F.; and Shulman, G.I. Etiology of insulin resistance. *Am. J. Med.* **2006**, *119*, S10-16
- ¹⁵⁵ Stephens, J.M.; Lee, J.; and Pilch, P.F. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 971-976.
- ¹⁵⁶ Rui, L.; Aguirre, V.; Kim, J.K.; Shulman, G.I.; Lee, A.; Corbould, A.; Dunaif, A.; and White, M.F. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 181-189.
- ¹⁵⁷ Jager, J.; Gremeaux, T.; Cormont, M.; Le Marchand-Brustel, Y.; and Tanti, J.F. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* **2007**, *148*, 241-251.
- ¹⁵⁸ Rotter, V.; Nagaev, I.; and Smith, U. 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.* **2003**, *278*, 45777-45784.
- ¹⁵⁹ Leguisamo, N.M.; Lehnen, A.M.; Machado, U.F.; Okamoto, M.M.; Markoski, M.M.; Pinto, G.H.; and Schaan, B.D. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc. Diabetol.* **2012**, *11*, 100.
- ¹⁶⁰ Hotamisligil, G.S. Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2003**, *27 Suppl 3*, S53-5.
- ¹⁶¹ Van Greevenbroek, M.M.; Schalkwijk, C.G.; and Stehouwer, C.D. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth. J. Med.* **2013**, *71*, 174-187.
- ¹⁶² Ghosh, S.; May, M.J.; and Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 225-260.
- ¹⁶³ Cai, D.; Yuan, M.; Frantz, D.F.; Melendez, P.A.; Hansen, L.; Lee, J.; and Shoelson, S.E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 183-190.
- ¹⁶⁴ Shoelson, S.E.; Lee, J.; and Goldfine, A.B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1793-1801.
- ¹⁶⁵ Maedler, K.; Sergeev, P.; Ris, F.; Oberholzer, J.; Joller-Jemelka, H.I.; Spinas, G.A.; Kaiser, N.; Halban, P.A.; and Donath, M.Y. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 851-860.

- ¹⁶⁶ Hotamisligil, G.; Shargill, N.; and Spiegelman, B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. **1993**, *259*, 87-91.
- ¹⁶⁷ Festa, A.; D'Agostino, R.; Howard, G.; Mykkanen, L.; Tracy, R.P.; and Haffner, S.M. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: The insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). *Circulation*. **2000**, *102*, 42-47.
- ¹⁶⁸ Yuan, M.; Konstantopoulos, N.; Lee, L.; Hansen, L.; Li, Z.W.; Karin, M.; and Shoelson, S.E. Reversal of obesity and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of ikkbeta. *Science*. **2001**, *293*, 1673-1677.
- ¹⁶⁹ Dandona, P.; Aljada, A.; Mohanty, P.; Ghanim, H.; Hamouda, W.; Assian, E.; and Ahmad, S. 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.* **2001**, *86*, 3257-3265.
- ¹⁷⁰ Lowe, G.; Woodward, M.; Hillis, G.; Rumley, A.; Li, Q.; Harrap, S.; Marre, M.; Hamet, P.; Patel, A.; Poulter, N.; and Chalmers, J. 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*. **2014**, *63*, 1115-1123.
- ¹⁷¹ Harris, T.B.; Ferrucci, L.; Tracy, R.P.; Corti, M.C.; Wacholder, S.; Ettinger, W.H.; Heimovitz, H.; Cohen, H.J.; and Wallace, R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.* **1999**, *106*, 506-512.
- ¹⁷² Ridker, P.M.; Rifai, N.; Pfeffer, M.; Sacks, F.; Lepage, S.; and Braunwald, E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. **2000**, *101*, 2149-2153.
- ¹⁷³ Libby, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 456S-460S.
- ¹⁷⁴ 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.* C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1310-1320.
- ¹⁷⁵ Yudkin, J.S.; Kumari, M.; Humphries, S.E.; and Mohamed-Ali, V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. **2000**, *148*, 209-214.
- ¹⁷⁶ Dalla Vestra, M.; Mussap, M.; Gallina, P.; Bruseghin, M.; Cernigoj, A.M.; Saller, A.; Plebani, M.; and Fioretto, P. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16 Suppl 1*, S78-82.
- ¹⁷⁷ Tousoulis, D.; Papageorgiou, N.; Androulakis, E.; Siasos, G.; Latsios, G.; Tentolouris, K.; and Stefanadis, C. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *62*, 667-676.

- 178 Hadi, H.A.; Carr, C.S.; and Al Suwaidi, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manag.* **2005**, *1*, 183-198.
- 179 Fèlétou, M.; and Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The wiggers award lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H985-1002.
- 180 Carrizzo, A.; Izzo, C.; Oliveti, M.; Alfano, A.; Virtuoso, N.; Capunzo, M.; Di Pietro, P.; Calabrese, M.; De Simone, E.; Sciarretta, S.; *et al.* The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 10.3390/ijms19102968.
- 181 Mikhed, Y.; Daiber, A.; and Steven, S. Mitochondrial oxidative, stress, mitochondrial DNA Damage and their role in age-related vascular dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 15918-15953.
- 182 Dhananjayan, R.; Koundinya, K.S.; Malati, T.; and Kutala, V.K. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian. J. Clin. Biochem.* **2016**, *31*, 372-379.
- 183 Apostolova, N.; Rocha, M.; Rovira-Llopis, S.; Banuls, C.; Falcon, R.; Castello, R.; Hernandez-Mijares, A.; and Victor, V.M. Mitochondria-Targeted Antioxidants as a Therapeutic Strategy for Protecting Endothelium in Cardiovascular Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 2989-3006.
- 184 Kaur, R.; Kaur, M.; and Singh, J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 121-018-0763-3.
- 185 Pickup, J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **2004**, *27*, 813-823.
- 186 Calverley, D.C.; Baldermann, L.V.; Heldt, M.L.; Kinney, G.L.; and Hokanson, J.E. Increased platelet Fc receptor expression in diabetes is limited to those with type 2 disease and low LDL cholesterol levels. *Atherosclerosis.* **2006**, *185*, 173-176.
- 187 Shiny, A.; Bibin, Y.S.; Shanthirani, C.S.; Regin, B.S.; Anjana, R.M.; Balasubramanyam, M.; Jebarani, S.; and Mohan, V. Association of neutrophil-lymphocyte ratio with glucose intolerance: an indicator of systemic inflammation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* **2014**, *16*, 524-530.
- 188 Vozarova, B.; Weyer, C.; Lindsay, R.S.; Pratley, R.E.; Bogardus, C.; and Tataranni, P.A. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes.* **2002**, *51*, 455-461.
- 189 Drechsler, M.; Duchene, J.; and Soehnlein, O. Chemokines control mobilization, recruitment, and fate of monocytes in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1050-1055.

- ¹⁹⁰ Langer, H.F.; and Chavakis, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 1211-1220.
- ¹⁹¹ Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; and Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678-689.
- ¹⁹² Muller, W.A. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet. Pathol.* **2013**, *50*, 7-22.
- ¹⁹³ Carlos, T.M.; and Harlan, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* **1994**, *84*, 2068-2101.
- ¹⁹⁴ Leick, M.; Azcutia, V.; Newton, G.; and Luscinskas, F.W. Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell. Tissue Res.* **2014**, *355*, 647-656.
- ¹⁹⁵ Leeuwenberg, J.F.; Smeets, E.F.; Neefjes, J.J.; Shaffer, M.A.; Cinek, T.; Jeunhomme, T.M.; Ahern, T.J.; and Buurman, W.A. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* **1992**, *77*, 543-549.
- ¹⁹⁶ Jain, R.K.; Munn, L.L.; and Fukumura, D. Measuring leukocyte-endothelial interactions in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* **2013**, *2013*, 561-563.
- ¹⁹⁷ Ling, X.; Ye, J.F.; and Zheng, X.X. 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).* **2003**, *35*, 567-572.
- ¹⁹⁸ Meigs, J.B.; Hu, F.B.; Rifai, N.; and Manson, J.E. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* **2004**, *291*, 1978-1986.
- ¹⁹⁹ Boulbou, M.S.; Koukoulis, G.N.; Makri, E.D.; Petinaki, E.A.; Gourgoulianis, K.I.; and Germanis, A.E. Circulating adhesion molecules levels in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Int. J. Cardiol.* **2005**, *98*, 39-44.
- ²⁰⁰ 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. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care.* **2013**, *36*, 1695-1702.
- ²⁰¹ 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.* Soluble Forms of Intercellular and Vascular Cell Adhesion Molecules Independently Predict Progression to Type 2 Diabetes in Mexican American Families. *PLoS One.* **2016**, *11*, e0151177.
- ²⁰² Alom-Ruiz, S.P.; Anilkumar, N.; and Shah, A.M. Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1089-1100.

- 203 Cook-Mills, J.M.; Marchese, M.E.; and Abdala-Valencia, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1607-1638.
- 204 Chait, A.; Brazg, R.L.; Tribble, D.L.; and Krauss, R.M. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am. J. Med.* **1993**, *94*, 350-356.
- 205 Ivanova, E.A.; Myasoedova, V.A.; Melnichenko, A.A.; Grechko, A.V.; and Orekhov, A.N. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1273042.
- 206 Libby, P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am. J. Cardiol.* **2003**, *91*, 3A-6A.
- 207 Napoli, C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1010*, 698-709.
- 208 Weber, C.; and Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1410-1422.
- 209 Badimon, L.; and Vilahur, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* **2014**, *276*, 618-632.
- 210 Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 36-46.
- 211 Chawla, A.; Chawla, R.; and Jaggi, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum? *Indian. J. Endocrino. Metab.* **2016**, *20*, 546-551.
- 212 Holman, R.R.; Paul, S.K.; Bethel, M.A.; Matthews, D.R.; and Neil, H.A. 10-Year Follow-Up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1577-1589.
- 213 Turner, R.C.; Cull, C.A.; Frighi, V.; and Holman, R.R. 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.* **1999**, *281*, 2005-2012.
- 214 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. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* **2000**, *321*, 405-412.
- 215 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.* 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.* **2018**, *24*, 91-120.
- 216 American Diabetes Association. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* **2018**, *41*, S55-S64.
- 217 Malmberg, K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study Group. *BMJ.* **1997**, *314*, 1512-1515.
- 218 Gaede, P.; Vedel, P.; Larsen, N.; Jensen, G.V.; Parving, H.H.; and Pedersen, O. (2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 383-393.
- 219 ACCORD Study Group; Buse, J.B.; Bigger, J.T.; Byington, R.P.; Cooper, L.S.; Cushman, W.C.; Friedewald, W.T.; Genuth, S.; Gerstein, H.C.; Ginsberg, H.N.; *et al.* Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Trial: Design and Methods. *Am. J. Cardiol.* **2007**, *99*, 21i-33i.
- 220 Calles-Escandón, J.; Lovato, L.C.; Simons-Morton, D.G.; Kendall, D.M.; Pop-Busui, R.; Cohen, R.M.; Bonds, D.E.; Fonseca, V.A.; Ismail-Beigi, F.; Banerji, M.A.; *et al.* Effect of intensive compared with standard glycemia treatment strategies on mortality by baseline subgroup characteristics: the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Diabetes Care.* **2010**, *33*, 721-727.
- 221 ADVANCE Collaborative Group; Patel, A.; MacMahon, S.; Chalmers, J.; Neal, B.; Billot, L.; Woodward, M.; Marre, M.; Cooper, M.; Glasziou, P.; *et al.* Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2560-2572.
- 222 Gregg, E.W.; Sattar, N.; and Ali, M.K. The changing face of diabetes complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2016**, *4*, 537-547.
- 223 Kaiser, N.; Sasson, S.; Feener, E.P.; Boukobza-Vardi, N.; Higashi, S.; Moller, D.E.; Davidheiser, S.; Przybylski, R.J.; and King, G.L. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes.* **1993**, *42*, 80-89.
- 224 Ruta, L.M.; Magliano, D.J.; Lemesurier, R.; Taylor, H.R.; Zimmet, P.Z.; and Shaw, J.E. Prevalence of diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in developing and developed countries. *Diabet. Med.* **2013**, *30*, 387-398.
- 225 Gheith, O.; Farouk, N.; Nampoory, N.; Halim, M.A.; and Al-Otaibi, T. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J. Nephroarmacol.* **2015**, *5*, 49-56.

- ²²⁶ 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. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care*. **2004**, *27 Suppl 1*, S79-83.
- ²²⁷ Van Dieren, S.; Beulens, J.W.; Van der Schouw, Y.T.; Grobbee, D.E.; and Neal, B. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2010**, *17 Suppl 1*, S3-8.
- ²²⁸ Morrish, N.J.; Wang, S.L.; Stevens, L.K.; Fuller, J.H.; and Keen, H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*. **2001**, *44*, S14-21.
- ²²⁹ Shah, A.D.; Langerberg, C.; Rapsomaniki, E.; Denaxas, S.; Pujades-Rodriguez, M.; Gale, C.P.; Deanfield, J.; Smeeth, L.; Timmis, A.; and Hemingway, H. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2015**, *3*, 105-113.
- ²³⁰ 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.* Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. **2010**, *375*, 2215-2222.
- ²³¹ Beckman, J.A.; Paneni, F.; Cosentino, F.; and Creager, M.A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 2444-2452.
- ²³² Aronson, D.; and Rayfield, E.J. How Hyperglycemia Promotes Atherosclerosis: Molecular Mechanisms. *Cardiovasc. Diabetol.* **2002**, *8*, 1.
- ²³³ Lorenzo, C.; Williams, K.; Hunt, K.J.; and Haffner, S.M. The national cholesterol education program – Adult treatment panel III, international diabetes federation, and World health organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care*. **2007**, *30*, 8-13.
- ²³⁴ Calabrese, V.; Cornelius, C.; Leso, V.; Trovato-Salinaro, A.; Ventimiglia, B.; Cavallaro, M.; Scuto, M.; Rizza, S.; Zanolli, L.; Neri, S.; *et al.* Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta*. **2012**, *1822*, 729-736.
- ²³⁵ Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Apostolova, N.; Borrás, C.; Jover, A.; Bañuls, C.; Sola, E.; and Victor, V.M. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1215-1221.
- ²³⁶ Kedziora-Kornatowska, K.; Szram, S.; Kornatowski, T.; Szadujkis-Szadurski, L.; Kedziora, J.; and Bartosz, G. Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron Exp. Nephrol.* **2003**, *95*, e134-43.

- 237 Balbi, M.E.; Tonin, F.S.; Mendes, A.M.; Borba, H.H.; Wiens, A.; Fernandez-Llimos, F.; and Pontarolo, R. Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*, 18-018-0318-5.
- 238 Xu, R.; Zhang, S.; Tao, A.; Chen, G.; and Zhang, M. Influence of vitamin E supplementation on glycaemic control: a meta-analysis of randomised controlled trials. *PLoS One.* **2014**, *9*, e95008.
- 239 Saraste, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science.* **1999**, *283*, 1488-1493.
- 240 Skulachev, V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.* **1999**, *20*, 139-184.
- 241 Jordán, J.; Galindo, M.F.; Tornero, D.; Benavides, A.; González, C.; Agapito, M.T.; González-García, C.; and Ceña, V. Superoxide anions mediate veratridine-induced cytochrome c release and caspase activity in bovine chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *137*, 993-1000.
- 242 Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp.* **2001**, *235*, 263-266.
- 243 Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47-95.
- 244 Martin, L.J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2012**, *107*, 355-415.
- 245 Dahm, C.C.; Moore, K.; and Murphy, M.P. Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 10056-10065.
- 246 Dröse, S.; Brandt, U.; and Wittig, I. Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1844*, 1344-1354.
- 247 Haines, T.H.; and Dencher, N.A. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **2002**, *528*, 35-39.
- 248 Fariss, M.W.; Chan, C.B.; Patel, M.; Van Houten, B.; and Orrenius, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol. Interv.* **2005**, *5*, 94-111.
- 249 Rovira-Llopis, S.; Rocha, M.; Falcon, R.; de Pablo, C.; Alvarez, A.; Jover, A.; Hernandez-Mijares, A.; and Victor, V.M. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1452-1458.

- 250 Halliwell, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends Pharmacol.Sci.* **2011**, *32*, 125-130.
- 251 Stocker, R.; and Keane, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 1381-1478.
- 252 Stephens, N.G.; Parsons, A.; Schofield, P.M.; Kelly, F.; Cheeseman, K.; and Mitchinson, M.J. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). *Lancet.* **1996**, *347*, 781-786.
- 253 GISSI-Prevenzione trial. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet.* **1999**, *354*, 447-455.
- 254 Rehman, A.; Collis, C.S.; Yang, M.; Kelly, M.; Diplock, A.T.; Halliwell, B.; and Rice-Evans, C. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthyvolunteers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 293-298.
- 255 Fraga, C.G.; Motchnik, P.A.; Wyrobek, A.J.; Rempel, D.M.; and Ames, B.N. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.* **1996**, *351*, 199-203.
- 256 Podmore, I.D.; Griffiths, H.R.; Herbert, K.E.; Mistry, N.; Mistry, P.; and Lunec, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature.* **1998**, *392*, 559.
- 257 Goodman, M.; Bostick, R.M.; Kucuk, O.; and Jones, D.P. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1068-1084.
- 258 Klein, E.A.; Thompson, I.M.; Tangen, C.M.; Crowley, J.J.; Lucia, M.S.; Goodman, P.J.; Minasian, L.M.; Ford, L.G.; Parnes, H.L.; Gaziano, J.M.; *et al.* Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* **2011**, *306*, 1549-1556.
- 259 Isaac, M.G.; Quinn, R.; and Tabet, N. Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2008**, *16*, CD002854.
- 260 Blacker, D. Mild cognitive impairment – no benefit from vitamin E, little from donepezil. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2439-2441.
- 261 Maiorino, M.; Zamburlini, A.; Roveri, A.; and Ursini, F. Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* **1993**, *330*, 174-176.
- 262 Halliwell, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now?. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75*, 637-644.
- 263 Smith, R.A.; Hartley, R.C.; Cochemé, H.M.; and Murphy, M.P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 341-352.

- ²⁶⁴ Murphy, M.P.; and Smith, R.A. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 235-250.
- ²⁶⁵ Serviddio, G.; Bellanti, F.; Sastre, J.; Vendemiale, G., and Altomare, E. Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases. *Curr Med. Chem.* **2010**, *17*, 2325-2337.
- ²⁶⁶ Szeto, H.H. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS J.* **2006**, *8*, E277-283.
- ²⁶⁷ Murphy, M.P.; and Smith, R.A. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 629-656.
- ²⁶⁸ Kelso, G.F.; Porteous, C.M.; Coulter, C.V.; Hughes, G.; Porteous, W.K.; Ledgerwood, E.C.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4588-4596.
- ²⁶⁹ Smith, R.A.; Porteous, C.M.; Gane, A.M.; and Murphy, M.P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 5407-5412.
- ²⁷⁰ Ross, M.F.; Prime, T.A.; Abakumova, I.; James, A.M.; Porteous, C.M.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochem. J.* **2008**, *411*, 633-645.
- ²⁷¹ Ross, M.F.; Kelso, G.F.; Blaikie, F.H.; James, A.M.; Cochemé, H.M.; Filipovska, A.; Da Ros, T.; Hurd, T.R.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry.* **2005**, *70*, 222-230.
- ²⁷² James, A.M.; Sharpley, M.S.; Manas, A.R.; Frerman, F.E.; Hirst, J.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Interaction of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14708-14718.
- ²⁷³ James, A.M.; Cochemé, H.M.; and Murphy, M.P. Mitochondria-targeted redox probes as tools in the study of oxidative damage and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 982-986.
- ²⁷⁴ Asin-Cayuela, J.; Manas, A.R.; James, A.M.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant. *FEBS Lett.* **2004**, *571*, 9-16.
- ²⁷⁵ Maroz, A.; Anderson, R.F.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 105-109.
- ²⁷⁶ Smith, R.A.; Adlam, V.J.; Blaikie, F.H.; Manas, A.R.; Porteous, C.M.; James, A.M.; Ross, M.F.; Logan, A.; Cochemé, H.M.; Trnka, J.; *et al.* Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 105-111.

- 277 Reily, C.; Mitchell, T.; Chacko, B.K.; Benavides, G.; Murphy, M.P.; and Darley-USmar, V. Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 86-93.
- 278 James, A.M.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 47-56.
- 279 Cochemé, H.M.; Kelso, G.F.; James, A.M.; Ross, M.F.; Trnka, J.; Mahendiran, T.; Asin-Cayuela, J.; Blaikie, F.H.; Manas, A.R.; Porteous, C.M.; *et al.* Mitochondrial targeting of quinones: therapeutic implications. *Mitochondrion.* **2007**, *7*, S94-102.
- 280 Fink, B.D.; Herlein, J.A.; Yorek, M.A.; Fenner, A.M.; Kerns, R.J.; and Sivitz, W.I. Bioenergetic effects of mitochondrial-targeted coenzyme Q analogs in endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *342*, 709-719.
- 281 Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; and Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drugdiscovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- 282 Pletjushkina, O.Y.; Lyamzaev, K.G.; Popova, E.N.; Nepryakhina, O.K.; Ivanova, O.Y.; Domnina, L.V.; Chernyak, B.V.; and Skulachev, V.P. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, *1757*, 518-524.
- 283 Solesio, M.E.; Prime, T.A.; Logan, A.; Murphy, M.P.; Del Mar Arroyo-Jimenez, M.; Jordán, J.; and Galindo, M.F. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ reduces aspects of mitochondrial fission in the 6-OHDA cell model of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1832*, 174-182.
- 284 Sun, C.; Liu, X.; Di, C.; Wang, Z.; Mi, X.; Liu, Y.; Zhao, Q.; Mao, A.; Chen, W.; Gan, L.; *et al.* MitoQ regulates autophagy by inducing a pseudo-mitochondrial membrane potential. *Autophagy.* **2017**, *13*, 730-738.
- 285 Lim, S.; Rashid, M.A.; Jang, M.; Kim, Y.; Won, H.; Lee, J.; Woo, J.T.; Kim, Y.S.; Murphy, M.P.; Ali, L.; Ha, J.; and Kim, S.S. Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic β -cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipototoxicity. *Cell. Physiol. Biochem.* **2001**, *28*, 873-886.
- 286 Esplugues, J.V.; Rocha, M.; Nuñez, C.; Bosca, I.; Ibiza, S.; Herance, J.R.; Ortega, A.; Serrador, J.M.; D'Ocon, P.; and Victor, V.M. Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 1067-1075.
- 287 Chacko, B.K.; Reily, C.; Srivastava, A.; Johnson, M.S.; Ye, Y.; Ulasova, E.; Agarwal, A.; Zinn, K.R.; Murphy, M.P.; Kalyanaraman, B.; *et al.* Prevention of diabetic nephropathy in Ins2(+/-)(Akita) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 9-19.

- 288 Mercer, J.R.; Yu, E.; Figg, N.; Cheng, K.K.; Prime, T.A.; Griffin, J.L.; Masoodi, M.; Vidal-Puig, A.; Murphy, M.P.; and Bennett, M.R. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM+/-/ApoE-/- mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 841-849.
- 289 Pung, Y.F.; Rocic, P.; Murphy, M.P.; Smith, R.A.; Hafemeister, J.; Ohanyan, V.; Guarini, G.; Yin, L.; and Chilian, W.M. Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 325-334.
- 290 Rao, V.A.; Klein, S.R.; Bonar, S.J.; Zielonka, J.; Mizuno, N.; Dickey, J.S.; Keller, P.W.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; and Shacter, E. The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitoquinone. *J. Biol Chem.* **2010**, *285*, 34447-34459.
- 291 Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; and Kalyanaraman, B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10043-10120.
- 292 Pokrzywinski, K.L.; Biel, T.G.; Kryndushkin, D.; and Rao, V.A. Therapeutic Targeting of the Mitochondria Initiates Excessive Superoxide Production and Mitochondrial Depolarization Causing Decreased mtDNA Integrity. *PLoS One.* **2016**, *11*, e0168283.
- 293 Snow, B.J.; Rolfe, F.L.; Lockhart, M.M.; Frampton, C.M.; O'Sullivan, J.D.; Fung, V.; Smith, R.A.; Murphy, M.P.; and Taylor, K.M. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2010**, *25*, 1670-1674.
- 294 Gane, E.J.; Weilert, F.; Orr, D.W.; Keogh, G.F.; Gibson, M.; Lockhart, M.M.; Frampton, C.M.; Taylor, K.M.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients. *Liver Int.* **2010**, *30*, 1019-1026.
- 295 Yousif, L.F.; Stewart, K.M.; Horton, K.L.; and Kelley, S.O. Mitochondria-penetrating peptides: sequence effects and model cargo transport. *Chembiochem.* **2009**, *10*, 2081-2088.
- 296 Zhao, K.; Zhao, G.M.; Wu, D.; Soong, Y.; Birk, A.V.; Schiller, P.W.; and Szeto, H.H. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34682-34690.
- 297 Zhao, K.; Luo, G.; Zhao, G.M.; Schiller, P.W.; and Szeto, H.H. Transcellular transport of a highly polar 3+ net charge opioid tetrapeptide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *304*, 425-432.

- 298 Zhao, K.; Luo, G.; Giannelli, S.; Szeto, H.H. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1796-1806.
- 299 Cho, S.; Szeto, H.H.; Kim, E.; Kim, H.; Tolhurst, A.T.; and Pinto, J.T. A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS31, attenuates ischemic brain injury by down-regulating CD36. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4634-4642.
- 300 Han, Z.; Varadharaj, S.; Giedt, R.J.; Zweier, J.L.; Szeto, H.H., and Alevriadou, B.R. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate heme oxygenase-1 expression in sheared endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 94-101.
- 301 Zhu, H.; Shan, L.; Schiller, P.W.; Mai, A.; and Peng, T. Histone deacetylase-3 activation promotes tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9429-9436.
- 302 Andersson, D.C.; Fauconnier, J.; Yamada, T.; Lacampagne, A.; Zhang, S.J.; Katz, A.; and Westerblad, H. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 1791-1801.
- 303 Calkins, M.J.; Manczak, M.; Mao, P.; Shirendeb, U.; and Reddy, P.H. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 4515-4529.
- 304 Li, J.; Chen, X.; Xiao, W.; Ma, W.; Li, T.; Huang, J.; Liu, X.; Liang, X.; Tang, S.; and Luo, Y. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 349-356.
- 305 Dai, D.F.; Chen, T.; Szeto, H.H.; Nieves-Cintrón, M.; Kutuyavin, V.; Santana, L.F.; and Rabinovitch, P.S. Mitochondrial targeted antioxidant peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *58*, 73-82.
- 306 Gilliam, L.A.; Moylan, J.S.; Patterson, E.W.; Smith, J.D.; Wilson, A.S.; Rabbani, Z.; and Reid, M.B. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2012**, *302*, C195-202.
- 307 Kloner, R.A.; Hale, S.L.; Dai, W.; Gorman, R.C.; Shuto, T.; Koomalsingh, K.J.; Gorman, J.H.; Sloan, R.C.; Frasier, C.R.; Watson, C.A.; *et al.* Reduction of ischemia/reperfusion injury with bendavia, a mitochondria-targeting cytoprotective peptide. *J. Am. Heart. Assoc.* **2012**, *1*, e001644.
- 308 Birk, A.V.; Liu, S.; Soong, Y.; Mills, W.; Singh, P.; Warren, J.D.; Seshan, S.V.; Pardee, J.D.; and Szeto, H.H. The mitochondria-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2013**, *24*, 1250-1261.

- 309 Szeto, H.H.; and Schiller, P.W. Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane--from discovery to clinical development. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2669-2679.
- 310 Osman, C.; Voelker, D.R.; and Langer, T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J. Cell. Biol.* **2011**, *192*, 7-16.
- 311 Acehan, D.; Xu, Y.; Stokes, D.L.; and Schlame, M. Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography. *Lab. Invest.* **2007**, *87*, 40-48.
- 312 Shibata, A.; Ikawa, K.; Shimooka, T.; and Terada, H. Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1192*, 71-78.
- 313 Nichols-Smith, S.; Teh, S.Y.; and Kuhl, T.L. Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1663*, 82-88.
- 314 Zhang, M.; Mileykovskaya, E.; and Dowhan, W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43553-43556.
- 315 Pfeiffer, K.; Gohil, V.; Stuart, R.A.; Hunte, C.; Brandt, U.; Greenberg, M.L.; and Schägger, H. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5287.-52880.
- 316 Mileykovskaya, E.; and Dowhan, W. (2009). Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1788*, 2084-2091.
- 317 Kiebish, M.A.; Yang, K.; Sims, H.F.; Jenkins, C.M.; Liu, X.; Mancuso, D.J.; Zhao, Z.; Guan, S.; Abendschein, D.R.; Han, X.; and Gross, R.W. Myocardial regulation of lipidomic flux by cardiolipin synthase: setting the beat for bioenergetic efficiency. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 25086-25097.
- 318 Bazán, S.; Mileykovskaya, E.; Mallampalli, V.K.; Heacock, P.; Sparagna, G.C.; and Dowhan, W. Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 401-411.
- 319 Fry, M.; and Green, D.E. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1874-1880.
- 320 Hoch, F.L. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1113*, 71-133.
- 321 Mileykovskaya, E.; Zhang, M.; and Dowhan, W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry.* **2005**, *70*, 154-158.

- 322 Zhang, M.; Mileykovskaya, E.; and Dowhan, W. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29403-29408.
- 323 Chicco, A.J.; and Sparagna, G.C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2007**, *292*, C33-C44.
- 324 Wittig, I.; and Schagger, H. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1787*, 672–680.
- 325 Schwall, C.T.; Greenwood, V.L.; and Alder, N.N. The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1817*, 1588–1596.
- 326 Maranzana, E.; Barbero, G.; Falasca, A.I.; Lenaz, G.; and Genova, M.L. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1469-1480.
- 327 Rytomaa, M.; and Kinnunen, P.K. Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1770-1774.
- 328 Rytomaa, M.; and Kinnunen, P.K. Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3197-3202.
- 329 Linker, R.A.; Lee, D.H.; Ryan, S.; Van Dam, A.M.; Conrad, R.; Bista, P.; Zeng, W.; Hronowsky, X.; Buko, A.; Chollate, S.; *et al.* Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain.* **2011**, *134*, 678-692.
- 330 Ross, M.F.; Prime, T.A.; Abakumova, I.; James, A.M.; Porteous, C.M.; Smith, R.A.; and Murphy, M.P. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochem. J.* **2008**, *411*, 633-645.
- 331 Przyklenk, K. Pharmacologic treatment of the stunned myocardium: the concepts and the challenges. *Coron. Artery Dis.* **2001**, *12*, 363-369.
- 332 Zhao, K.; Zhao, G.M.; Wu, D.; Soong, Y.; Birk, A.V.; Schiller, P.W.; and Szeto, H.H. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **2008**, *279*, 34682-34690.
- 333 Winterbourn, C.C.; Parsons-Mair, H.N.; Gebicki, S.; Gebicki, J.M.; and Davies, M.J. Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 241-248.
- 334 Reddy, P.H.; Tripathi, R.; Troung, Q.; Tirumala, K.; Reddy, T.P.; Anekonda, V.; Shirendeb, U.P.; Calkins, M.J.; Reddy, A.P.; Mao, P.; and Manczak, M. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to

- mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1822*, 639-649.
- 335 Manczak, M.; Mao, P.; Calkins, M.J.; Cornea, A.; Reddy, A.P.; Murphy, M.P.; Szeto, H.H.; Park, B.; and Reddy, P.H. Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20*, S609-631.
- 336 Whiteman, M.; Spencer, J.P.; Szeto, H.H.; and Armstrong, J.S. Do mitochondriotropic antioxidants prevent chlorinative stress-induced mitochondrial and cellular injury?. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 641-650.
- 337 Rahman, M.; Mofarrahi, M.; Kristof, A.S.; Nkengfac, B.; Harel, S.; and Hussain, S.N. Reactive oxygen species regulation of autophagy in skeletal muscles. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 443-459.
- 338 Cho, J.; Won, K.; Wu, D.; Soong, Y.; Liu, S.; Szeto, H.H.; and Hong, M.K. Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats. *Coron. Artery Dis.* **2007**, *18*, 215-220.
- 339 Antonenko, Y.N.; Avetisyan, A.V.; Bakeeva, L.E.; Chernyak, B.V.; Chertkov, V.A.; Domnina, L.V.; Ivanova, O.Y.; Izyumov, D.S.; Khailova, L.S.; Klishin, S.S.; *et al.* Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry.* **2008**, *73*, 1273-1287.
- 340 Reddy, P.H. Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *40*, 245-256.
- 341 Sweetwyne, M.T.; Pippin, J.W.; Eng, D.G.; Hudkins, K.L.; Chiao, Y.A.; Campbell, M.D.; Marcinek, D.J.; Alpers, C.E.; Szeto, H.H.; Rabinovitch, P.S.; *et al.* The mitochondrial-targeted peptide, SS-31, improves glomerular architecture in mice of advanced age. *Kidney Int.* **2017**, *91*, 1126-1145.
- 342 Szeto, H.H.; Liu, S.; Soong, Y.; Seshan, S.V.; Cohen-Gould, L.; Manichev, V.; Feldman, L.C.; and Gustafsson, T. Mitochondria Protection after Acute Ischemia Prevents Prolonged Upregulation of IL-1 β and IL-18 and Arrests CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 1437-1449.
- 343 Yang, L.; Zhao, K.; Calingasan, N.Y.; Luo, G.; Szeto, H.H.; and Beal, M.F. Mitochondria targeted peptides protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2095-2104.
- 344 Thomas, D.A.; Stauffer, C.; Zhao, K.; Yang, H.; Sharma, V.K.; Szeto, H.H.; and Suthanthiran, M. Mitochondrial targeting with antioxidant peptide SS-31 prevents mitochondrial depolarization, reduces islet cell apoptosis, increases islet cell yield, and improves posttransplantation function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 213-222.
- 345 Siegel, M.P.; Kruse, S.E.; Percival, J.M.; Goh, J.; White, C.C.; Hopkins, H.C.; Kavanagh, T.J.; Szeto, H.H.; Rabinovitch, P.S.; and Marcinek, D.J. Mitochondrial-targeted peptide rapidly

- improves mitochondrial energetics and skeletal muscle performance in aged mice. *Aging Cell*. **2013**, *12*, 763-771.
- 346 Anderson, E.J.; Lustig, M.E.; Boyle, K.E.; Woodlief, T.L.; Kane, D.A.; Lin, C.T.; Price, J.W.; Kang, L.; Rabinovitch, P.S.; Szeto, H.H.; Houmard, J.A.; Cortright, R.N.; Wasserman, D.H.; and Neuffer, P.D. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 573-581.
- 347 Szeto, H.H.; Liu, S.; Soong, Y.; Wu, D.; Darrah, S.F.; Cheng, F.Y.; Zhao, Z.; Ganger, M.; Tow, C.Y.; and Seshan, S.V. Mitochondria-targeted peptide accelerates ATP recovery and reduces ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 1041-1052.
- 348 Petri, S.; Kiaei, M.; Damiano, M.; Hiller, A.; Wille, E.; Manfredi, G.; Calingasan, N.Y.; Szeto, H.H.; and Beal, M.F. Cell-permeable peptide antioxidants as a novel therapeutic approach in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 1141-1148.
- 349 Taskinen, M.R.; and Boren, J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. **2015**, *239*, 483-495.
- 350 Mooradian, A.D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2009**, *5*, 150-159.
- 351 Chen, G.; McAlister, F.A.; Walker, R.L.; Hemmelgarn, B.R.; and Campbell, N.R. Cardiovascular outcomes in framingham participants with diabetes: the importance of blood pressure. *Hypertension*. **2011**, *57*, 891-897.
- 352 Ridker, P.M. C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 2129-2138.
- 353 Devaraj, S.; Xu, D.Y.; and Jialal, I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation*. **2003**, *107*, 398-404.
- 354 Ikeda, U.; Takahashi, M.; and Shimada, K. C-reactive protein directly inhibits nitric oxide production by cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2003**, *42*, 607-611.
- 355 Wellen, K.E.; and Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1111-1119.
- 356 Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C.J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J.S.; Tartaglia, L.A.; *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1821-1830.
- 357 Schmidt-Arras, D.; and Rose-John, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1403-1415.

- 358 Viridis, A.; Colucci, R.; Bernardini, N.; Blandizzi, C.; Taddei, S.; and Masi, S. Microvascular endothelial dysfunction in human obesity: role of TNF-alpha. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 341-348.
- 359 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.; et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **2018**, *48*, e12985.
- 360 Gahmberg, C.G.; Valmu, L.; Fagerholm, S.; Kotovuori, P.; Ihanus, E.; Tian, L.; and Pessa-Morikawa, T. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 549-555.
- 361 Goetz, D.J.; Greif, D.M.; Shen, J.; and Lusinskas, F.W. Cell-cell adhesive interactions in an in vitro flow chamber. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *96*, 137-145.
- 362 Mittal, M.; Siddiqui, M.R.; Tran, K.; Reddy, S.P.; and Malik, A.B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 1126-1167.
- 363 Shurtz-Swirski, R.; Sela, S.; Herskovits, A.T.; Shasha, S.M.; Shapiro, G.; Nasser, L.; and Kristal, B. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* **2001**, *24*, 104-110.
- 364 Yu, T.; Robotham, J.L.; and Yoon, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2653-2658.
- 365 Widlansky, M.E.; Wang, J.; Shenouda, S.M.; Hagen, T.M.; Smith, A.R.; Kizhakekuttu, T.J.; Kluge, M.A.; Weihrauch, D.; Gutterman, D.D.; and Vita, J.A. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Transl. Res.* **2010**, *156*, 15-25.
- 366 Jacob, R.A.; and Sotoudeh, G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr. Clin. Care.* **2002**, *5*, 66-74.
- 367 Graham, D.; Huynh, N.N.; Hamilton, C.A.; Beattie, E.; Smith, R.A.; Cochemé, H.M.; Murphy, M.P.; and Dominiczak, A.F. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertension.* **2009**, *54*, 322-328.
- 368 Adlam, V.J.; Harrison, J.C.; Porteous, C.M.; James, A.M.; Smith, R.A.; Murphy, M.P.; and Sammut, I.A. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1088-1095.
- 369 Rivera-Barahona, A.; Alonso-Barroso, E.; Pérez, B.; Murphy, M.P.; Richard, E.; and Desviat, L.R. Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionicacidemia. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *122*, 43-50.

- 370 Ribeiro, R.F.; Dabkowski, E.R.; Shekar, K.C.; O Connell, K.A.; Hecker, P.A.; and Murphy, M.P. MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *117*, 18-29.
- 371 Hou, Y.; Li, S.; Wu, M.; Wei, J.; Ren, Y.; Du, C.; Wu, H.; Han, C.; Duan, H.; and Shi, Y. Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2016**, *310*, F547-559.
- 372 Wu, J.; Zhang, M.; Hao, S.; Jia, M.; Ji, M.; Qiu, L.; Sun, X.; Yang, J.; and Li, K. Mitochondria-Targeted Peptide Reverses Mitochondrial Dysfunction and Cognitive Deficits in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *52*, 783-791.
- 373 Szeto, H.H. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 601-619.
- 374 Mogensen, M.; Sahlin, K.; Fernström, M.; Glintborg, D.; Vind, B.F.; Beck-Nielsen, H.; and Højlund, K. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* **2007**, *56*, 1592-1599.
- 375 Boudina, S.; Sena, S.; O'Neill, B.T.; Tathireddy, P.; Young, M.E.; and Abel, E.D. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation.* **2005**, *112*, 2686-2695.
- 376 Barroso, M.; Florindo, C.; Kalwa, H.; Silva, Z.; Turanov, A.A.; Carlson, B.A.; de Almeida, I.T.; Blom, H.J.; Gladyshev, V.N.; Hatfield, D.L.; *et al.* Inhibition of cellular methyltransferases promotes endothelial cell activation by suppressing glutathione peroxidase 1 protein expression. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 15350-15362.
- 377 Kubes, P.; Suzuki, M.; and Granger, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 4651-4655.
- 378 Kar, S.; and Kavdia, M. Local oxidative and nitrosative stress increases in the microcirculation during leukocytes-endothelial cell interactions. *PLoS One.* **2012**, *7*, e38912.
- 379 Su, Y.; Qadri, S.M.; Hossain, M.; Wu, L.; and Liu, L. Uncoupling of eNOS contributes to redox-sensitive leukocyte recruitment and microvascular leakage elicited by methylglyoxal. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 1762-1774.
- 380 Scheuermann-Freestone, M. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation.* **2003**, *107*, 3040-3046.
- 381 Croston, T.L.; Thapa, D.; Holden, A.A.; Tveter, K.J.; Lewis, S.E.; Shepherd, D.L.; Nichols, C.E.; Long, D.M.; Olfert, I.M.; Jagannathan, R.; *et al.* Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, *307*, H54-65.

- 382 Oelze, M.; Kröller-Schön, S.; Steven, S.; Lubos, E.; Doppler, C.; Hausding, M.; Tobias, S.; Brochhausen, C.; Li, H.; Torzewski, M.; *et al.* Glutathione peroxidase-1 deficiency potentiates dysregulatory modifications of endothelial nitric oxide synthase and vascular dysfunction in aging. *Hypertension*. **2014**, *63*, 390-396.
- 383 Benzler, J.; Ganjam, G.K.; Pretz, D.; Oelkrug, R.; Koch, C.E.; Legler, K.; Stöhr, S.; Culmsee, C.; Williams, L.M.; and Tups, A. Central inhibition of IKK β /NF- κ B signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Diabetes*. **2015**, *64*, 2015-2027.
- 384 Lightfoot, A.P.; Sakellariou, G.K.; Nye, G.A.; McArdle, F.; Jackson, M.J.; Griffiths, R.D.; and McArdle, A. SS-31 attenuates TNF- α induced cytokine release from C2C12 myotubes. *Redox Biol*. **2015**, *6*, 253-259.
- 385 Hao, S.; Ji, J.; Zhao, H.; Shang, L.; Wu, J.; Li, H.; Qiao, T.; and Li, K. Mitochondrion-Targeted peptide SS-31 Inhibited oxidized low-density lipoproteins-induced foam cell formation through both ROS scavenging and inhibition of cholesterol influx in RAW264.7 cells. *Molecules*. **2015**, *20*, 21287-21297.
- 386 Lewis, P.; Stefanovic, N.; Pete, J.; Calkin, A.C.; Giunti, S.; Thallas-Bonke, V.; Jandeleit-Dahm, K.A.; Allen, T.J.; Kola, I.; Cooper, M.E.; *et al.* Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. **2007**, *115*, 2178-2187.
- 387 Cooper, D.; Stokes, K.Y.; Taylor, A.; and Granger, D.N. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc. Toxicol*. **2002**, *2*, 165-180.
- 388 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.* SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol. Cell*. **2011**, *44*, 177-190.
- 389 De Kreutzenberg, S.V.; Ceolotto, G.; Papparella, I.; Bortoluzzi, A.; Semplicini, A.; Dalla Man, C.; Cobelli, C.; Fadini, G.P.; and Avogaro, A. Downregulation of the longevity-associated protein Sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes*. **2010**, *59*, 1006-1015.
- 390 Yoshizaki, T.; Schenk, S.; Imamura, T.; Babendure, J.L.; Sonoda, N.; Bae, E.J.; Oh, D.Y.; Lu, M.; Milne, J.C.; Westphal, C.; *et al.* SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. **2010**, *298*, E419-428.
- 391 Baker, R.G.; Hayden, M.S.; and Ghosh, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell. Metab*. **2011**, *13*, 11-22.
- 392 Houtkooper, R.H.; Pirinen, E.; and Auwerx, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **2012**, *13*, 225-238.

- 393 Tornatore, L.; Thotakura, A.K.; Bennett, J.; Moretti, M.; and Franzoso, G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell. Biol.* **2012**, *22*, 557-566.
- 394 Johnson, A.R.; Milner, J.J.; and Makowski, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev.* **2012**, *249*, 218-238.
- 395 Kauppinen, A.; Suuronen T.; Ojala, J.; Kaarniranta, K.; and Salminen, A. Antagonistic crosstalk between NFκB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 1939-1948.
- 396 López-Domènech, S.; Abad-Jiménez, Z.; Iannantuoni, F.; de Marañón, A.M.; Rovira-Llopis, S.; Morillas, C.; Bañuls, C.; Víctor, V.M.; and Rocha, M. Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity. *Mol. Metab.* **2019**, *19*, 24-33.
- 397 Leahy, J.L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 197-209.
- 398 Nishikawa, T.; and Araki, E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 343-353.
- 399 Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgern, J.; and Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* **1997**, *46*, 1733-1742.
- 400 Gallego-Villar, L.; Pérez, B.; Ugarte, M.; Desviat, L.R.; and Richard, E. Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *452*, 457-461.
- 401 Panzhinskiy, E.; Hua, Y.; Culver, B.; Ren, J.; and Nair, S. Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes. *Diabetologia.* **2013**, *56*, 598-607.
- 402 Kozutsumi, Y.; Segal, M.; Normington, K.; Gething, M.J.; and Sambrook, J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature.* **1988**, *332*, 462-464.
- 403 Ellgaard, L.; Sevier, C.S.; and Bulleid, N.J. How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum?. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 32-43.
- 404 Van der Vlies, D.; Makkinje, M.; Jansens, A.; Braakman, I.; Verkleij, A.J.; Wirtz, K.W.; and Post, J.A. Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5*, 381-387.
- 405 Plaisance, V.; Brajkovic, S.; Tenenbaum, M.; Favre, D.; Ezanno, H.; Bonnefond, A.; Bonner, C.; Gmyr, V.; Kerr-Conte, J.; Gauthier, B.R.; *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative

- Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL. *PLoS One*. **2016**, *11*, e0163046.
- 406 Chakravarthi, S.; and Bulleid, N.J. Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39872-39879.
- 407 Hale, A.N.; Ledbetter, D.J.; Gawriluk, T.R.; and Rucker, E.B. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*. **2013**, *9*, 951-972.
- 408 Gonzalez, C.D.; Lee, M.S.; Marchetti, P.; Pietropaolo, M.; Towns, R.; Vaccaro, M.I.; Watada, H.; and Wiley, J.W. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*. **2011**, *7*, 2-11.
- 409 Scherz-Shouval, R.; and Elazar, Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 30-38.
- 410 Masini, M.; Bugliani, M.; Lupi, R.; del Guerra, S.; Boggi, U.; Filipponi, F.; Marselli, L.; Masiello, P.; and Marchetti, P. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia*. **2009**, *52*, 1083-1086.
- 411 Wang, Y.; Li, Y.; Yin, J.; Wang, Y.; Zhu, L.; Xie, G.; and Pan, S. (2013). Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes. *Autophagy*. *9*, 272-277.
- 412 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. Is Autophagy Altered in the Leukocytes of Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid. Redox Signal*. **2015**, *23*, 1050-1056.
- 413 Diaz-Morales, N.; Iannantuoni, F.; Escribano-Lopez, I.; Bañuls, C.; Rovira-Llopis, S.; Sola, E.; Rocha, M.; Hernandez-Mijares, A.; and Victor, V.M. Does Metformin Modulate Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Type 2 Diabetic Peripheral Blood Mononuclear Cells? *Antioxid. Redox Signal*. **2018**, *28*, 1562-1569.
- 414 Matsunaga, K.; Saitoh, T.; Tabata, K.; Omori, H.; Satoh, T.; Kurotori, N.; Maejima, I.; Shirahama-Noda, K.; Ichimura, T.; Isobe, T., *et al.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 385-396.
- 415 Lee, Y.K.; and Lee, J.A. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* **2016**, *49*, 424-430.
- 416 Levine, B.; Mizushima, N.; and Virgin, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. **2011**, *469*, 323-335.

ANEXO I. PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients



Irene Escribano-Lopez^{a,1}, Noelia Diaz-Morales^{a,1}, Susana Rovira-Llopis^{a,b}, Arantxa Martinez de Marañon^a, Samuel Orden^c, Angeles Alvarez^c, Celia Bañuls^{a,b}, Milagros Rocha^{a,b,c}, Michael P. Murphy^d, Antonio Hernandez-Mijares^{a,b,e}, Victor M. Victor^{a,b,c,f,*}

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

^b Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain

^c CIBERehd - Department of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

^d MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, United Kingdom

^e Department of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

^f Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Leukocytes
Oxidative stress
Inflammation
Endothelium
Type 2 diabetes
MitoQ

ABSTRACT

It is not known if the mitochondria-targeted antioxidants such as mitoquinone (MitoQ) can modulate oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in T2D patients.

We aimed to evaluate the beneficial effect of MitoQ on oxidative stress parameters and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes of T2D patients.

The study population consisted of 98 T2D patients and 71 control subjects. We assessed metabolic and anthropometric parameters, mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, glutathione peroxidase 1 (GPX-1), NFκB-p65, TNFα and leukocyte-endothelium interactions.

Diabetic patients exhibited higher weight, BMI, waist circumference, SBP, DBP, glucose, insulin, HOMA-IR, HbA1c, triglycerides, hs-CRP and lower HDL-c with respect to controls.

Mitochondrial ROS production was enhanced in T2D patients and decreased by MitoQ. The antioxidant also increased GPX-1 levels and PMN rolling velocity and decreased PMN rolling flux and PMN adhesion in T2D patients. NFκB-p65 and TNFα were augmented in T2D and were both reduced by MitoQ treatment.

Our findings support that the antioxidant MitoQ has an anti-inflammatory and antioxidant action in the leukocytes of T2D patients by decreasing ROS production, leukocyte-endothelium interactions and TNFα through the action of NFκB. These data suggest that mitochondria-targeted antioxidants such as MitoQ should be investigated as a novel means of preventing cardiovascular events in T2D patients.

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is currently one of the foremost health concerns, especially in developed countries. T2D is related to obesity and insulin resistance (IR), but the key mechanisms relating IR and T2D in obese subjects are yet to be determined. That said, inflammation, enhanced mitochondrial ROS production and the infiltration of

leukocytes into the pancreas seem to be implicated [1].

There is considerable evidence that a chronic, low-grade inflammatory response is ongoing in and actually precedes T2D and related syndromes [2,3] and this inflammation may be due, in part, to the effects of hyperglycemia or other metabolic abnormalities on white blood cells [4]. In this sense, it has been demonstrated that there is an activation of NFκB under IR conditions [5,6]. In this chronic inflam-

Abbreviations: BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, 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; IR, insulin resistance; LDL, low density lipoprotein cholesterol; PMN, polymorphonuclear leukocytes; SBP, systolic blood pressure; T2D, type 2 diabetes; TPP, triphenylphosphonium

* Correspondence to: FISABIO, University Hospital Doctor Peset, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain.

E-mail address: victor.victor@uv.es (V.M. Victor).

¹ These authors have contributed equally.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.017>

Received 7 September 2016; Received in revised form 4 October 2016; Accepted 12 October 2016

Available online 27 October 2016

2213-2317/ © 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

matory state, inflammatory cells such as leukocytes are vulnerable to and markedly damaged by hyperglycemia. In fact, these actions can contribute to the undermined innate immune function and increased risk of infection among T2D patients [7].

Oxidative stress and mitochondrial impairment have been implicated in the etiology of IR associated with T2D [8,9]. The pathogenesis of mitochondrial dysfunction in obesity or any diabetes-related disease is multifactorial, and can also play an important role in pancreatic β cell failure in T2D [10,11]. Furthermore, it has been demonstrated that mitochondria undergo biogenesis in response to high levels of glucose, but the increased biogenesis is insufficient to accommodate a high metabolic demand [12]. In addition, obesity, which is related to T2D, is associated to increased levels of free fatty acids, inflammation, mitochondrial ROS and, therefore, oxidative stress [13].

Leukocytes, and in particular polymorphonuclear leukocytes (PMNs), constitute a critical host defence against infections associated with T2D. Furthermore, PMNs may contribute to the oxidative stress and inflammation associated with T2D. In fact, the onset of atherosclerosis involves the recruitment of leukocytes to the endothelium, a process that begins when these cells roll over the endothelial cells and come to a halt, eventually adhering firmly. In this sense, a potential role of mitochondrial dynamics and function in the maintenance of endothelial cell function in T2D has been postulated [14].

In the aforementioned context, therapies that decrease mitochondrial oxidative damage could help decrease the deleterious effects of T2D [11]. Mitoquinone (MitoQ) is a mitochondria-targeted antioxidant derived from ubiquinone, and is targeted to mitochondria by covalent attachment to a lipophilic triphenylphosphonium (TPP) cation [15–17]. Due to the large mitochondrial membrane potential, this cation is accumulated within the mitochondria inside cells. Mitochondria-targeted antioxidants are protective *in vivo* against oxidative damage in different pathologies, such as cancer, T2D, cardiovascular and neurodegenerative disorders [18–20].

The aim of the current study was to evaluate the effect of MitoQ on oxidative stress parameters in leukocytes isolated from T2D patients, in particular the potential regulation of leukocyte-endothelial interactions and their effects on NF κ B.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

98 T2D patients attending the Endocrinology and Nutrition Service of the University Hospital Doctor Peset (Valencia, Spain) and 71 controls adjusted by age and sex were enrolled in this study. T2D was diagnosed according to the American Diabetes Association's criteria. Diagnosis was confirmed when a patient fulfilled at least one of the following criteria: (1) levels of fasting serum glucose ≥ 126 mg/dl or random serum glucose ≥ 200 mg/dL on at least two occasions; (2) HbA1c $\geq 6.5\%$; or (3) antidiabetic medication. Subjects with any of the following conditions were excluded from the study: history of cardiovascular disease (including ischemic heart disease, stroke, peripheral vascular disease, and chronic disease related to cardiovascular risk); presence of morbid obesity; insulin treatment, autoimmune disease; and infectious, malignant, organic, haematological or inflammatory disease.

The study protocols were conducted according to the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee of the University Hospital Doctor Peset. 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), body mass index (BMI; kg/m²), waist circumference (cm), and systolic and diastolic blood pressure (SBP/DBP; mmHg) were measured.

2.2. Biochemical determinations

Blood was obtained from the antecubital vein and centrifuged (1300g, 10 min, 4 °C), and biochemical determinations were performed as previously described [21]. By means of an enzymatic method, total cholesterol, levels of glucose and triglycerides were determined in serum. Low density lipoprotein (LDL) content was calculated with Friedewald's formula, and high density lipoprotein (HDL) levels were obtained using a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., CA, US). Insulin levels were determined by immunochemiluminescence, and insulin resistance was estimated using the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR=[fasting insulin (μ U/mL) \times fasting glucose (mg/dl)]/405). Percentage of HbA1c was determined with an automatic glycohemoglobin analyzer (Arkray Inc., Kyoto, Japan) and high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels were assessed by an immunonephelometric assay.

2.3. Cell isolation

Leukocytes were isolated from heparinized blood samples that had been incubated with dextran (3%) for 45 min. Supernatant was collected, placed over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and spun at 650g 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 240g. The leukocyte pellet was then washed and resuspended in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich, MO, US). Cells were counted with a Scepter 2.0 cell counter (Millipore Iberica, Madrid, Spain) and divided into different samples, one of which was incubated with 0.5 μ M of MitoQ for 30 min, and the other with decyl-TPP in the same conditions.

2.4. Reactive oxygen species production

Mitochondrial ROS production was assessed using the fluorescent probe MitoSOX (5×10^{-6} mol/l, 30 min) by fluorometry using a fluorescence microscope (IX81; Olympus) coupled to the static cytometry software "ScanR" (Olympus). Nuclei were visualized with Hoechst 33342. Measures of fluorescence are referred to as % of control.

2.5. Western blot analysis

PMNs isolated from healthy or diabetic patients were resuspended at a density of 10^6 cells/mL in 3 mL of complete RPMI (RPMI supplemented with 10% FBS). For each control or patient two samples were prepared: the control sample and the treated (0.5 μ M MitoQ, 30 min) sample. The non-antioxidant decyl-TPP was also used as a control compound. In the meantime, two T25 flasks with confluent HUVEC were washed twice with PBS at 37 °C. Afterwards, PMN cells (control and MitoQ/TPP) were added to the HUVEC flask and incubated and shaken for 10 min (up to 130 rpm, mimicking the leukocyte-endothelium protocol) in a horizontal shaker at a fixed temperature of 37 °C. Cells were then pelleted and stored at -80 °C for subsequent determinations. Cell pellets 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 μ M 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) [22]. Protein concentrations were determined by a BCA protein assay (Thermo Scientific, IL, US) after 15 min centrifugation. Protein samples (25 μ g) were resolved on 10% acrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. After blocking, membranes were incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. The following primary antibodies were used: GPX-1 (Thermo Fisher), NF κ B-p65 (Abcam), TNF α (Abcam) and Actin (Sigma). 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, Marne La Vallée, France). The signals were analyzed and quantified by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat) and all values were normalized to actin.

2.6. Leukocyte-endothelium interaction assay

Adhesion assays under flow conditions were carried out using a parallel plate flow chamber *in vitro* model as previously described [21]. Coverslips with confluent HUVEC monolayers were employed 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, rolling flux and adhesion were calculated as described elsewhere [21]. TNF α (10 ng/mL, 4 h) was used as a positive control for HUVEC, and platelet activating factor (1 μ M, 1 h) for leukocytes.

2.7. Data analysis

Data analysis was performed with SPSS 17.0. The values in Tables are mean \pm SD. Bar graphs show mean \pm SEM. Comparisons between 2 groups (Table 1) were performed by a Student's *t*-test for normally distributed samples, and a Mann–Whitney *U* test for non-normally distributed samples. Chi-Square test was used to compare proportions among groups. Data were compared with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc test. Analysis of covariance was employed to minimize the potential influence of BMI. Serum lipid and biochemical parameter changes were analyzed by means of a

univariate general linear model using BMI as a covariate. Correlations were calculated using Spearman's correlation coefficient. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

3. Results

We evaluated 98 T2D patients and 71 control subjects (Table 1). Diabetic patients exhibited higher weight, BMI, waist circumference, SBP, DBP, fasting glucose, insulin, HOMA-IR and HbA1c ($p < 0.001$) than controls. When data were adjusted by BMI, statistical differences remained unchanged. The lipid profile of diabetic subjects was characterized by higher triglyceride and lower HDL-c levels with respect to controls ($p < 0.001$). However, due to the lipid-lowering treatment received by most of the T2D patients (65% of patients were taking statins and 6% ezetimibe), levels of total cholesterol and LDL-c were lower than in controls ($p < 0.001$). Inflammation, measured as hs-CRP levels, was also more pronounced in diabetic patients *vs* controls ($p < 0.001$). Statistical differences remained when analyses were adjusted by BMI ($p < 0.01$).

3.1. Mitochondrial ROS and glutathione peroxidase levels

Leukocytes from diabetic patients displayed enhanced levels of MitoSOX oxidation, which is consistent with an increase in mitochondrial ROS production (Fig. 1A, $p < 0.01$). However, the mitochondrial targeted antioxidant MitoQ decreased MitoSOX oxidation in diabetic leukocytes ($p < 0.05$) to values similar to those in controls. MitoQ did not alter MitoSOX oxidation in controls (Fig. 1A).

When glutathione peroxidase 1 (GPX-1) was evaluated by western blot, differences were not observed between diabetic and control subjects (Fig. 1B). The presence of MitoQ increased GPX1 levels in diabetic cell pellets ($p < 0.05$) with respect to control and diabetic groups without MitoQ.

None of these oxidative stress parameters were affected by decyl-TPP treatment (Fig. 1A–B).

3.2. Leukocyte-endothelium interactions

When leukocyte-endothelium interactions were assessed in controls and T2D patients, a decrease in leukocyte rolling velocity (Fig. 2A, $p < 0.001$) and an increase in leukocyte rolling flux (Fig. 2B, $p < 0.001$) and adhesion (Fig. 2C, $p < 0.01$) were observed in T2D patients. Those effects were reversed in the presence of MitoQ, which increased leukocyte rolling velocity (Fig. 2A, $p < 0.05$) and reduced leukocyte rolling flux (Fig. 2B, $p < 0.05$) and adhesion (Fig. 2C, $p < 0.01$) in T2D patients. MitoQ had no effects in controls and decyl-TPP had no effect on leukocyte-endothelium interactions.

3.3. Levels of NF κ B-p65 and TNF α

Diabetic patients showed an increase in NF κ B-p65 levels (Fig. 3A, $p < 0.05$). MitoQ decreased the levels of NF κ B-p65 in those cells (Fig. 3A, $p < 0.05$), showing an anti-inflammatory effect, and did not modify NF κ B-p65 levels in the control condition. In addition, NF κ B-p65 levels correlated negatively with GPX1 levels ($p < 0.05$; $r = -0.566$) and positively with glucose levels ($p < 0.05$; $r = 0.564$) and PMN rolling flux ($p < 0.05$; $r = 0.576$).

In relation to TNF α levels, there was an increase in diabetic patients (Fig. 3B, $p < 0.05$) to a similar extent as that observed with NF κ B-p65 levels, and MitoQ again exerted an anti-inflammatory effect by reducing TNF α levels (Fig. 3B, $p < 0.05$). MitoQ did not have any effect on control pellets. Furthermore, TNF α levels correlate positively with PMN rolling flux ($p < 0.05$; $r = 0.580$) and NF κ B-p65 ($p < 0.001$; $r = 0.860$).

Decyl-TPP treatment did not affect NF κ B-p65 or TNF α levels.

Table 1
Baseline characteristics of the study population.

	Control	T2D	p Value	BMI-adjusted p Value
N	71	98	–	
Male %	45.1	51.7	0.452	
Age (years)	57.5 \pm 8.2	59.1 \pm 8.3	0.263	
Weight (kg)	70.6 \pm 12.0	82.2 \pm 13.7	< 0.001	
BMI (kg/m ²)	25.8 \pm 4.0	30.7 \pm 4.4	< 0.001	
Waist (cm)	88.4 \pm 14.3	105.5 \pm 10.4	< 0.001	
SBP (mmHg)	129 \pm 21	143 \pm 21	< 0.001	< 0.01
DBP (mmHg)	74 \pm 10	83 \pm 15	< 0.001	< 0.01
Glucose (mg/dl)	91.6 \pm 12.6	146.8 \pm 49.4	< 0.001	< 0.001
Insulin (μ U/mL)	8.43 \pm 4.48	15.70 \pm 10.91	< 0.001	< 0.001
HOMA-IR	1.99 \pm 1.18	5.50 \pm 4.19	< 0.001	< 0.001
HbA1c (%)	5.27 \pm 0.28	6.97 \pm 1.11	< 0.001	< 0.001
Total cholesterol (mg/dl)	193.7 \pm 39.3	168.8 \pm 37.5	< 0.001	< 0.001
HDL-c (mg/dl)	54.4 \pm 11.3	45.1 \pm 10.7	< 0.001	< 0.001
LDL-c (mg/dl)	121.1 \pm 31.7	96.2 \pm 32.8	< 0.001	< 0.001
Triglycerides (mg/dl)	74.0 (59.5; 97.0)	114.0 (87.0; 157.8)	< 0.001	< 0.001
hs-CRP (mg/l)	0.94 (0.46; 2.53)	3.46 (1.37; 5.72)	< 0.001	< 0.001

Data are expressed as mean \pm SD for parametric data or as median (25th and 75th percentiles) for non-parametric data. Means were compared by a Student's *t*-test for normally distributed samples and a Mann–Whitney *U* test for non-normally distributed samples. Adjustments by BMI were performed by means of a univariate general linear model. A Chi-Square test was used to compare proportions among groups. HOMA-IR=fasting insulin (μ U/ml) \times fasting glucose (mg/dl)/405.

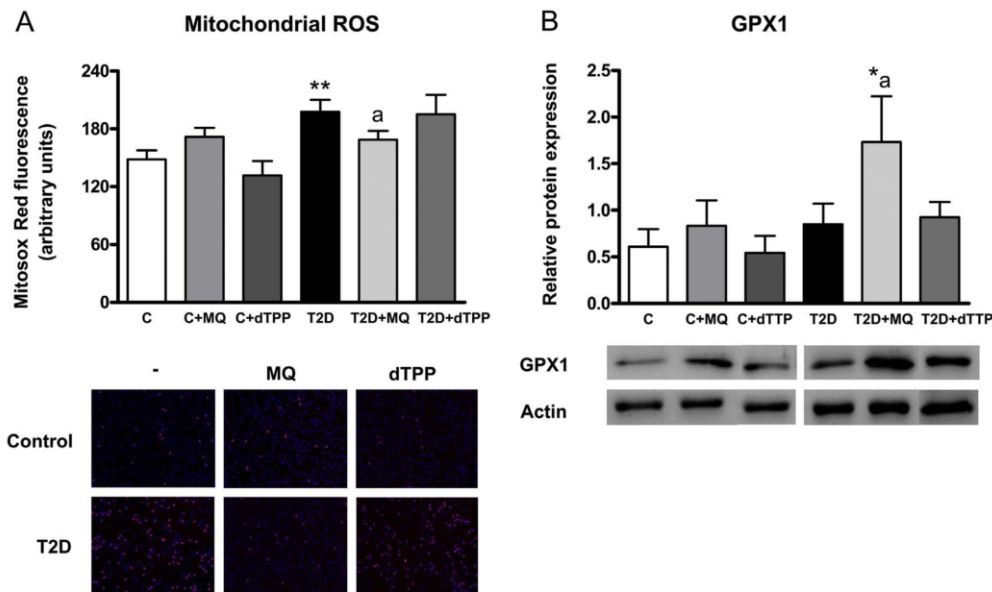


Fig. 1. (A) Levels of MitoSox oxidation in controls and T2D patients in presence and absence of MitoQ or decyl-TPP (30 min, 0.5 μM) and representative fluorescence microscopy images (B) Levels of GPX-1 (25 kDa) measured by Western blot in controls and T2D patients in presence and absence of MitoQ or decyl-TPP (30 min, 0.5 μM). * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs control; ^ap < 0.05 vs T2D patients.

4. Discussion

In the present study we report an increase in fasting levels of glucose, insulin, HOMA-IR, triglycerides, HbA1c and hs-CRP in T2D patients. Given that BMI was also higher in this group, we adjusted the data for this parameter, obtaining the same results.

Vascular complications and oxidative stress are features of T2D. Furthermore, oxidative stress is a key event in the immunobiology of inflammatory responses. In previous studies we have shown that oxidative stress and mitochondrial dysfunction are present in the leukocytes of T2D patients and are enhanced in patients with vascular complications [21,23]. In the present study we have determined that increased mitochondrial ROS production occurs in leukocytes of T2D patients, suggesting that leukocyte oxidative stress and mitochondrial function are altered during long-term exposure to glucose.

Several studies have demonstrated that mitochondrial antioxidant enzymes can protect against oxidant-induced damage under hyperglycemic conditions [24,25]. Furthermore, protecting mitochondria seems to play an important role in arteriogenesis and angiogenesis under oxidative stress conditions [26]. For these reasons, we believe that mitochondria-targeted antioxidants can modulate oxidative stress and may have beneficial effects in T2D. We have used MitoQ because this compound is biocompatible and can be administered safely *in vivo* with

no reported toxic effects. In fact, MitoQ can prevent ischemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction [27] and also protects against endothelial dysfunction in *in vivo* and *in vitro* models [28,29]. MitoQ has also demonstrated beneficial effects by preventing diabetic nephropathy in *Ins2^{+/-}/Akt1^{-/-}* mice [18], or by modulating muscle lipid profile and improving mitochondrial respiration in obesogenic diet-fed rats [30]. However, it has been also demonstrated that TPP⁺ compounds such as MitoQ can disrupt mitochondrial function at concentrations frequently observed in cell culture and that this behaviour is dependent on the linker group and independent of antioxidant properties [31].

ROS may have important roles in hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction and microvascular complications associated to IR [32,33]. Indeed, it has been demonstrated that T2D patients have an increased risk of developing cardiovascular events, which may be related to oxidative stress [21]. In relation to this, the results of the present study show that treatment with MitoQ reduces levels of ROS and increases those of GPX1, thus exhibiting an antioxidant effect. Indeed, it has been previously demonstrated that MitoQ can reduce ROS and modulate GPX1 under oxidative stress conditions such as propionic acidemia [34].

Hypertension and atherosclerosis are inflammatory states characterized by leukocyte recruitment to arterial walls [35]. We have used an

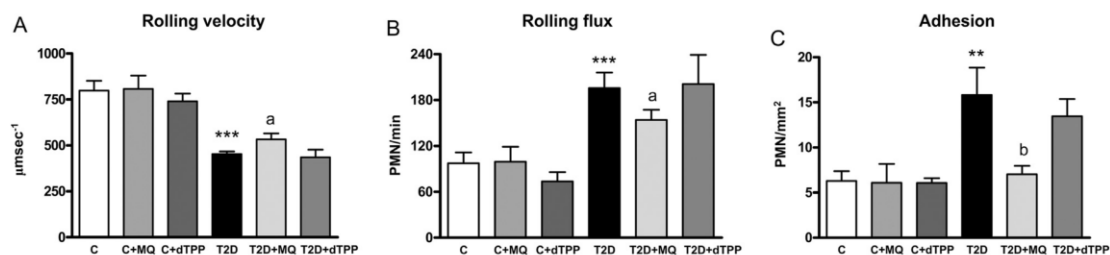


Fig. 2. Leukocyte/endothelium interactions in T2D patients and control subjects in presence and absence of MitoQ or decyl-TPP (30 min, 0.5 μM). (A) PMN rolling velocity (μmsecond⁻¹), (B) rolling flux (PMN per minute) and (C) PMN adhesion (PMN per square millimetre). **p < 0.01 and ***p < 0.001 vs control. ^ap < 0.05 and ^bp < 0.01 vs T2D patients.

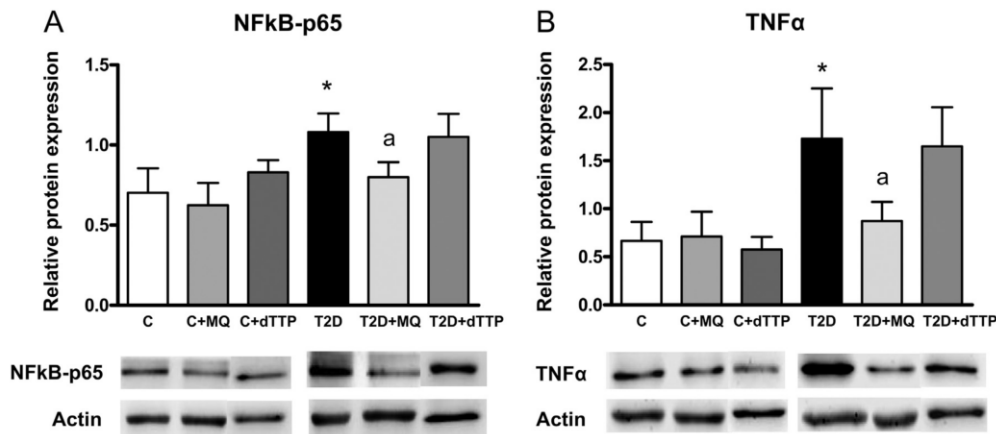


Fig. 3. Evaluation of protein expression by Western blot of p65-NFκB (55 kDa) (A) and TNFα (23 kDa) (B) in T2D patients and control subjects in presence and absence of MitoQ or decyl-TPP (30 min, 0.5 μM). *p < 0.05 vs control. ^ap < 0.05 vs T2D patients.

in vitro system to study this process, in which human leukocytes flow over a monolayer of human endothelial cells with a shear rate equivalent to that observed *in vivo* [36]. This mimics the process of rolling and adhesion that precedes inflammation *in vivo*, and which is essential to maintain vascular homeostasis and integrity. If these interactions are enhanced, endothelial dysfunction and vascular damage associated with many CVD can take place. In previous studies, we have demonstrated that T2D patients display features of chronic inflammation and enhanced leukocyte-endothelium interactions, and that these disturbances can be aggravated in the presence of vascular complications [21–23]. Our findings show that the inflammatory state is enhanced in T2D patients. In fact, we have witnessed an increase in PMN rolling flux and adhesion and a decrease in PMN rolling velocity by which leukocyte-endothelium interactions were induced. Interestingly, we have seen that treatment with MitoQ increases PMN rolling velocity and decreases PMN rolling flux and adhesion in the leukocytes of T2D patients, suggesting a protective cardiovascular role. Indeed, MitoQ has previously been reported to decrease ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model [37] and to decrease features of metabolic syndrome in an ATM^{+/-}/ApoE^{-/-} mice model [38].

NFκB is a common inflammatory factor and plays an important role in the regulation of cytokines in diabetic nephropathy [39]. Furthermore, NFκB activity is significantly increased in T2D patients with nephropathy compared to those without renal impairment [5,40]. In line with these studies, we report that the expression of p65-NFκB is increased in T2D patients, thus highlighting the importance of this transcription factor. In addition, NFκB levels correlate positively with glucose levels, which confirms that hyperglycemia is closely associated with inflammation. In this sense, a previous study showed that inhibition of the IKKβ/NFκB pathway improves glucose tolerance in obese mice, pointing to a central role of this signaling pathway in the development of T2D [41]. We also found a negative association between p65-NFκB and GPX1, which was reported in a previous study in which lack of GPX1 promoted upregulation of p65-NFκB in mouse aortas [42]. Moreover, we have observed an increase in the proinflammatory cytokine TNFα; interestingly, treatment with MitoQ decreased the levels of NFκB and, in consequence, those of TNFα. In relation with this, it has been demonstrated that mitochondria-targeted antioxidants such as MitoTempol and MitoQ can protect pancreatic β-cells against oxidative stress by decreasing NFκB activity, promoting their survival, and increasing insulin secretion in cell models of the glucotoxicity and lipotoxicity associated with T2D [43]. Interestingly, we have seen that both NFκB and TNFα levels correlate

positively with leukocyte rolling flux, highlighting the role of these proinflammatory markers in the atherosclerotic process.

Our study reveals a potential protective role of mitochondrial targeted antioxidants in the vasculature. However, a larger cohort of patients would have provided more conclusive observations, especially with respect to the correlation studies. In addition, a control group with a similar BMI to that of our T2D patients would have strengthened our comparisons.

Overall, our findings provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms occurring in leukocytes/endothelium of T2D patients. They suggest that increased inflammation and oxidative stress, together with NFκB activation and increased proinflammatory cytokine TNFα, contribute to the enhanced interaction between these cells, which augments the risk of CVD. Importantly, treatment with MitoQ modulates these actions, thus preventing oxidative stress and chronic inflammation, which suggests that this compound has potential beneficial effects for preventing cardiovascular diseases in T2D.

Acknowledgments

We thank Brian Normanly (University of Valencia) for his editorial assistance.

This study was financed by grants PI13/01025, PI13/00073, PI15/01424, PI16/1083 and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute, PROMETEOII 2014/035 and GV/2016/169 by Ministry of Education of the Valencian Regional Government, UGP-14-93, UGP-14-95, UGP15-193 by Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), SAF2015 67678 R by Ministerio de Economía y Competitividad 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. is recipient of a predoctoral fellowship from Carlos III Health Institute (FI14/00125). C.B. is recipient of a postdoctoral contract from Carlos III Health Institute (CD14/00043).

No potential conflicts of interest relevant to this article are reported. The authors have nothing to disclose.

References

- [1] M. Mittal, M.R. Siddiqui, K. Tran, S.P. Reddy, A.B. Malik, Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxid. Redox Signal* 20 (2014) 1126–1167.
- [2] J.C. Pickup, M.B. Mattock, G.D. Chusney, D. Burt, NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with

- metabolic syndrome X, *Diabetologia* 40 (1997) 1286–1292.
- [3] B.B. Duncan, M.I. Schmidt, J.S. Pankow, C.M. Ballantyne, D. Couper, A. Vigo, R. Hoogeveen, A.R. Folsom, G. Heiss, atherosclerosis risk in communities study. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study, *Diabetes* 52 (2003) 1799–1805.
- [4] K.O. Smitherman, J.E. Peacock, Infectious emergencies in patients with diabetes mellitus, *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 9 (1995) 53–77.
- [5] B. Yi, X. Hu, H. Zhang, J. Huang, J. Liu, J. Hu, W. Li, L. Huang, Nuclear NF- κ B p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP-1, RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy, *PLoS One* 9 (2014) e99633.
- [6] S.K. Malin, J.P. Kirwan, C.L. Sia, F. González, Pancreatic β -cell dysfunction in polycystic ovary syndrome: role of hyperglycemia-induced nuclear factor- κ B activation and systemic inflammation, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308 (2015) E770–E777.
- [7] E. Galkina, K. Ley, Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 165–197.
- [8] S. Boudina, S. Sena, B.T. O'Neill, P. Tathireddy, M.E. Young, E.D. Abel, Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity, *Circulation* 112 (2005) 2686–2695.
- [9] A. Hernandez-Mijares, M. Rocha, N. Apostolova, C. Borrás, A. Jover, C. Bañuls, E. Sola, V.M. Victor, Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 1215–1221.
- [10] W.I. Sivitz, M.A. Yorek, Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal* 12 (2010) 537–577.
- [11] K. Green, M.D. Brand, M.P. Murphy, Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes* 53 (2004) S110–S118.
- [12] J.L. Edwards, A. Quattrini, S.I. Lentz, C. Figueroa-Romero, F. Cerri, C. Backus, Y. Hong, E.L. Feldman, Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in neurons, *Diabetologia* 53 (2010) 160–169.
- [13] P. Dandona, A. Aljada, A. Chaudhuri, P. Mohanty, R. Garg, Metabolic syndrome - a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation, *Circulation* 111 (2005) 1448–1454.
- [14] J.A. Kim, Y. Wei, J.R. Sowers, Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance, *Circ. Res.* 102 (2008) 401–414.
- [15] A.M. James, M.S. Sharpley, A.R.B. Manas, F.E. Frerman, J. Hirst, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Interaction of the mitochondria targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14708–14718.
- [16] M.P. Murphy, R.A.J. Smith, Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations, *Annu. Rev. Pharm.* 47 (2007) 629–656.
- [17] R.A.J. Smith, V.J. Adlam, F.H. Blaikie, A.R.B. Manas, C.M. Porteous, A.M. James, M.F. Ross, A. Logan, H.M. Cocheme, J. Trnka, T.A. Prime, I. Abakumova, B.A. Jones, A. Filipovska, M.P. Murphy, Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 105–111.
- [18] B.K. Chacko, C. Reily, A. Srivastava, M.S. Johnson, Y.Z. Ye, E. Ulasova, A. Agarwal, K.R. Zinn, M.P. Murphy, B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, Prevention of diabetic nephropathy in *Ins2(+/-)*(Akita) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ, *Biochem. J.* 432 (2010) 9–19.
- [19] C. Lu, D.W. Zhang, M. Whiteman, J.S. Armstrong, Is antioxidant potential of the mitochondrial targeted ubiquinone derivative MitoQ conserved in cells lacking mtDNA?, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 651–660.
- [20] N. Apostolova, V.M. Victor, Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications, *Antioxid. Redox Signal.* 22 (2015) 686–729.
- [21] A. Hernandez-Mijares, M. Rocha, S. Rovira-Llopis, C. Bañuls, L. Bellod, C. De Pablo, A. Alvarez, I. Roldan-Torres, E. Sola-Izquierdo, V.M. Victor, Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia, *Diabetes Care* 36 (2013) 1695–1702.
- [22] S. Rovira-Llopis, C. Bañuls, N. Apostolova, C. Morillas, A. Hernandez-Mijares, M. Rocha, V.M. Victor, Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients?, *Antioxid. Redox Signal.* 21 (2014) 1759–1765.
- [23] S. Rovira-Llopis, M. Rocha, R. Falcon, C. de Pablo, A. Alvarez, A. Jover, A. Hernandez-Mijares, V.M. Victor, Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes?, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 1452–1458.
- [24] S. Munusamy, L.A. MacMillan-Crow, Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of Mitochondrial dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 1149–1157.
- [25] R.A. Kowluru, V. Kowluru, Y. Xiong, Y.S. Ho, Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 1191–1196.
- [26] S. Dai, Y. He, H. Zhang, L. Yu, T. Wan, Z. Xu, D. Jones, H. Chen, W. Min, Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin promotes ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 495–502.
- [27] V.J. Adlam, J.C. Harrison, C.M. Porteous, A.M. James, R.A. Smith, M.P. Murphy, I.A. Sammut, Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury, *FASEB J.* 19 (2005) 1088–1095.
- [28] J.V. Esplugues, M. Rocha, C. Nuñez, I. Bosca, S. Ibiza, J.R. Herance, A. Ortega, J.M. Serrador, P. D'Ocon, V.M. Victor, Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants, *Circ. Res.* 99 (2006) 1067–1075.
- [29] D. Graham, N.N. Huynh, C.A. Hamilton, E. Beattie, R.A. Smith, H.M. Cochemé, M.P. Murphy, A.F. Dominiczak, Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy, *Hypertension* 54 (2009) 322–328.
- [30] C. Coudray, G. Fouret, K. Lambert, C. Ferreri, J. Rieusset, A. Blachnio-Zabielska, J. Lecomte, R. Ebabe Elle, E. Badia, M.P. Murphy, C. Feillet-Coudray, A mitochondria-targeted ubiquinone modulates muscle lipid profile and improves mitochondrial respiration in obese diet-fed rats, *Br. J. Nutr.* 115 (2016) 1155–1166.
- [31] C. Reily, T. Mitchell, B.K. Chacko, G. Benavides, M.P. Murphy, V. Darley-Usmar, Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics, *Redox Biol.* (1) (2013) 86–93.
- [32] F. Giacco, M. Brownlee, Oxidative stress and diabetic complications, *Circ. Res.* 107 (2010) 1058–1070.
- [33] D. Prieto, C. Contreras, A. Sánchez, Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance, *Curr. Vasc. Pharm.* 12 (2014) 412–426.
- [34] L. Gallego-Villar, B. Pérez, M. Ugarte, L.R. Desviat, E. Richard, Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 452 (3) (2014) 457–461.
- [35] P. Libby, Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868–874.
- [36] V.M. Victor, M. Rocha, C. Bañuls, A. Alvarez, C. de Pablo, M. Sanchez-Serrano, M. Gomez, A. Hernandez-Mijares, Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (10) (2011) 3115–3122.
- [37] A.J. Dare, A. Logan, T.A. Prime, S. Rogatti, M. Goddard, E.M. Bolton, J.A. Bradley, G.J. Pettigrew, M.P. Murphy, K. Saeb-Parsy, The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model, *J. Heart Lung Transpl.* 34 (2015) 1471–1480.
- [38] J.R. Mercer, E. Yu, N. Figg, K.K. Cheng, T.A. Prime, J.L. Griffin, M. Masoodi, A. Vidal-Puig, M.P. Murphy, M.R. Bennett, The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in *ATM+/-/ApoE-/-* mice, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 841–849.
- [39] S. Mezzano, C. Aros, A. Droguett, M.E. Burgos, L. Ardiles, C. Flores, H. Schneider, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy, *Nephrol. Dial. Transpl.* 19 (2004) 2505–2512.
- [40] M.A. Hofmann, S. Schiekofer, B. Isermann, M. Kanitz, M. Henkels, M. Joswig, A. Treusch, M. Morcos, T. Weiss, V. Borcea, A.K. Abdel Khalek, J. Amiral, H. Tritschler, E. Ritz, P. Wahl, R. Ziegler, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B, *Diabetologia* 42 (1999) 222–232.
- [41] J. Benzler, G.K. Ganjam, D. Pretz, R. Oelkrug, C.E. Koch, K. Legler, S. Stöhr, C. Culmsee, L.M. Williams, A. Tups, Central inhibition of IKK β /NF- κ B signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance, *Diabetes* 64 (2015) 2015–2027.
- [42] P. Lewis, N. Stefanovic, J. Pete, A.C. Calkin, S. Giunti, V. Thallas-Bonke, K.A. Jandeleit-Dahm, T.J. Allen, I. Kola, M.E. Cooper, J.B. de Haan, Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice, *Circulation* 115 (2007) 2178–2187.
- [43] S. Lim, M.A. Rashid, M. Jang, Y. Kim, H. Won, J. Lee, J.T. Woo, Y.S. Kim, M.P. Murphy, L. Ali, J. Ha, S.S. Kim, Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic β -cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity, *Cell Physiol. Biochem.* 28 (2011) 873–886.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes

Received: 1 November 2017
Accepted: 2 October 2018
Published online: 26 October 2018

Irene Escribano-Lopez¹, Noelia Diaz-Morales¹, Francesca Iannantuoni¹, Sandra Lopez-Domenech¹, Aranzazu M de Marañon¹, Zaida Abad-Jimenez¹, Celia Bañuls¹, Susana Rovira-Llopis¹, Jose R Herance², Milagros Rocha^{1,3} & Victor M Victor^{1,3,4}

There is growing focus on mitochondrial impairment and cardiovascular diseases (CVD) in type 2 diabetes (T2D), and the development of novel therapeutic strategies in this context. It is unknown whether mitochondrial-targeting antioxidants such as SS-31 protect sufficiently against oxidative damage in diabetes. We aimed to evaluate if SS-31 modulates SIRT1 levels and ameliorates leukocyte-endothelium interactions, oxidative stress and inflammation in T2D patients. Anthropometric and metabolic parameters were studied in 51 T2D patients and 57 controls. Production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential, glutathione content, leukocyte-endothelium interactions, NFκB-p65, TNFα and SIRT1 levels was measured in leukocytes treated or not with SS-31. We observed increased mitochondrial ROS production that was restored by SS-31 treatment. SS-31 also increased mitochondrial membrane potential, glutathione content, SIRT1 levels and leukocyte rolling velocity and reduced rolling flux and adhesion in T2D patients. NFκB-p65 and TNFα, which were enhanced in diabetic patients, were also reduced by SS-31 treatment. Our results reveal that SS-31 exerts beneficial effects on the leukocytes of T2D patients by reducing oxidative stress, leukocyte-endothelium interactions, NFκB and TNFα and by increasing SIRT1 levels. These actions support its use as a potential agent against CVD risk.

Type 2 diabetes (T2D) is an increasingly prevalent disease and a serious health problem worldwide, as it can markedly reduce life expectancy^{1,2}. T2D is associated with diverse cardiovascular risk factors, such as insulin resistance, obesity, hypertension, dyslipidaemia and non-alcoholic fatty liver disease, as well as platelet and homeostatic abnormalities that increase the risk of thrombosis³. As a consequence, T2D is implicated in a series of disorders, particularly cardiovascular diseases (CVD), though the underlying mechanisms are yet to be determined.

Type 2 diabetes has been associated with enhanced production of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, an alteration of redox state and cellular homeostasis. Mitochondria are key organelles in the regulation of the metabolism, the major site of ATP production, and one of the main sources of ROS. In this sense, class III histone deacetylase sirtuin-1 (SIRT1) is a key protein which controls pathways that regulate the metabolic components of mitochondria⁴. Furthermore, SIRT1 directly interacts with and deacetylates the peroxisome

¹Service of Endocrinology, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain. ²Medical Molecular Imaging Research Group, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), CIBBIM Nanomedicine, Passeig de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ³CIBERhd - Department of Pharmacology, University of Valencia, Valencia, Spain. ⁴Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.R. (email: milagros.rocha@uv.es) or V.M.V. (email: victor.victor@uv.es)

proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)^{5,6}, the master regulator of mitochondrial activity and a main player in mitochondrial biogenesis and function.

Mitochondria are particularly vulnerable to hyperglycaemic conditions, enhancing ROS production and oxidative stress^{7,8}. In this regard, mitochondrial dysfunction and oxidative stress have been related to the onset of T2D and insulin resistance⁹. Indeed, our group has demonstrated impaired mitochondrial function and subsequent enhancement of ROS production in diabetic patients, as well as changes in mitochondrial membrane potential and a reduction of antioxidant content¹⁰.

Inflammation plays a vital role in host defences, since immune cells release pro-inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor alpha (TNF α), to protect against injury; for example, several studies suggest that inflammation is a key player in the pathogenesis of some glucose disorders¹¹. During the progression of T2D, a chronic and low-grade inflammatory response takes place due, in part, to the effects of hyperglycaemia on white blood cells^{12,13}. It has been demonstrated that the nuclear factor kappa B (NF κ B), a central regulator of immunity, inflammation and cell survival, is activated under these conditions^{14–16}. This inflammatory state involves an enhanced adhesion of leukocytes to the surface of the endothelium, after which they migrate in order to destroy pathogens by generating production of ROS. Given that enhanced ROS production under oxidative stress contributes to the mitochondrial injury that promotes endothelial dysfunction and, in turn, leukocyte adhesion, inflammation, thrombosis and smooth muscle cell proliferation¹⁷, the search for novel therapies that ameliorate mitochondrial oxidative stress in metabolic diseases such as T2D is paramount.

SS-31 (D-Arg-2'6'-dimethylTyr-Lys-Phe-NH₂) is a cell-permeable mitochondria-targeted antioxidant tetrapeptide with an alternating aromatic-cationic structure. SS-31 can scavenge mitochondrial ROS, thereby promoting mitochondrial function and inhibiting mitochondrial permeability transition^{18,19}. These effects are due to the dimethyltyrosine contained within SS-31, and are not exerted by other related peptides such as SS-20, which lack this structure²⁰. As a small peptide, SS-31 is water-soluble and offers other advantages, such as the capacity to target and concentrate at the inner mitochondrial membrane in a membrane potential-independent manner and to protect against mitochondrial depolarization²¹.

In the present study, we investigate the potential therapeutic benefits of SS-31 with respect to SIRT1 levels, oxidative stress parameters and leukocyte-endothelial interactions and evaluate its impact on NF κ B in leukocytes from T2D patients.

Results

Anthropometric and metabolic parameters. We evaluated 51 T2D patients and compared them with 57 healthy subjects (Table 1). Non-statistical differences were observed among the groups with respect to sex, age, and diastolic blood pressure. However, compared to the control group, diabetic patients displayed higher weight ($p < 0.01$), body-mass index (BMI), waist circumference, systolic blood pressure (BP), HOMA-IR, insulin, HbA1c and fasting glucose levels ($p < 0.001$). T2D patients showed a typical lipid profile of reduced levels of HDL-c ($p < 0.001$) and elevated levels of triglycerides ($p < 0.01$) with respect to controls. However, levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and total cholesterol were lower T2D patients than in controls ($p < 0.001$) due lipid-lowering medication (67% were taking statins, 12% fibrates and 2.4% ezetimibe). In terms of the oral antidiabetic treatment received by patients, 61.4% were treated with metformin, 33.3% with DPP-4 inhibitors, 15.9% with GLP-1 agonists, 6.8% with SGLT2 inhibitors, 4.5% with sulphonylureas and 2.3% with glitazones. In comparison with control subjects T2D patients displayed a more pro-inflammatory state, manifested by their levels of high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) ($p < 0.01$). Statistical significance remained after adjustment for BMI, with the exception of triglycerides and hs-CRP ($p < 0.01$).

Mitochondrial Function and Oxidative Stress. Higher levels of total ROS production were observed in the leukocytes of T2D patients ($p < 0.01$, Fig. 1a). In addition, diabetic patients exhibited higher levels of mitochondrial ROS production than control subjects ($p < 0.001$, Fig. 1b). Interestingly, treatment with the mitochondria-targeted antioxidant SS-31 reduced both parameters in the leukocytes of T2D patients ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). Confocal microscopy in human leukocytes revealed MitoSOX (red fluorescence) localization in the mitochondria. Furthermore, rotenone (a complex I inhibitor) induced an increase in Mitosox fluorescence indicating mitochondrial superoxide production (see Supplementary Fig. S1).

CMFDA fluorescence, which is proportional to the content of the free thiol form of GSH in leukocytes, was lower in T2D patients than in healthy subjects ($p < 0.05$, Fig. 1c). SS-31-treated leukocytes of T2D patients exhibited significantly higher levels of the antioxidant GSH ($p < 0.05$) than non-treated leukocytes. Furthermore, TMRM fluorescence, which is employed to estimate mitochondrial membrane potential, was significantly lower in diabetic patients than control subjects ($p < 0.01$, Fig. 1d). Treatment with the mitochondria-targeting antioxidant SS-31 increased mitochondrial membrane potential in diabetic patients ($p < 0.05$) with respect to basal conditions. In the supplementary data, confocal microscope images are appended to show that TMRM fluorescence corresponds with a mitochondria pattern (see Supplementary Fig. S1), showing a decrease in the fluorescence intensity consequently to mitochondrial depolarization with CCCP addition.

SS-31 did not have a notable influence on leukocytes of control subjects and SS-20 did not modify oxidative stress parameters (Fig. 1a–d).

Evaluation of SIRT1 protein levels and sirt1 gene expression. SIRT1 levels were lower in T2D patients than in controls, both in terms of protein levels ($p < 0.05$, Fig. 2a) and gene expression ($p < 0.05$, Fig. 2b). Treatment with SS-31 reversed these effects by enhancing both the protein expression ($p < 0.05$, Fig. 2a) and gene expression ($p < 0.05$, Fig. 2b) of SIRT1. SS-20 did not have an effect, highlighting the particular beneficial antioxidant effects of SS-31.

Parameter (Unit) [Reference Interval]*	Control	Type 2 Diabetes	p Value	BMI adjusted p Value
N	57	51	—	—
Male %	42.1	51.9	ns	—
Age (years)	53.7 ± 7.7	57.1 ± 10.3	ns	—
Weight (kg)	72.8 ± 18.0	84.7 ± 16.4	<0.01	—
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 4.1	30.6 ± 5.5	<0.001	—
Waist (cm)	87.7 ± 12.7	103.5 ± 11.7	<0.001	—
Systolic BP (mmHg)	124 ± 20	146 ± 14	<0.001	<0.001
Diastolic BP (mmHg)	75 ± 10	67 ± 31	ns	ns
Fasting Glucose (mg/dl) [70–105]	94.1 ± 9.4	153.7 ± 45.0	<0.001	<0.001
Insulin (μU/mL) [2.0–14.0]	7.19 ± 2.62	12.56 ± 6.57	<0.001	<0.05
HOMA-IR [0.0–3.8]	1.63 ± 0.73	4.55 ± 2.73	<0.001	<0.001
HbA1c (%) [4.0–5.6]	5.3 ± 0.3	7.1 ± 1.2	<0.001	<0.001
Total cholesterol (mg/dl) [80–200]	203.7 ± 34.5	158.7 ± 39.1	<0.001	<0.001
HDL-c (mg/dl) [35–70]	57.2 ± 19.7	43.5 ± 9.8	<0.001	<0.01
LDL-c (mg/dl) [40–150]	126.5 ± 29.5	87.0 ± 31.7	<0.001	<0.001
Triglycerides (mg/dl) [30–150]	90.5 (62.8; 150.5)	132.0 (92.8; 164.8)	<0.01	ns
hs-CRP (mg/l) [0.0–1.69]	1.17 (0.44; 2.17)	2.45 (1.22; 5.39)	<0.01	ns

Table 1. Baseline characteristics of the subjects. Data are shown as mean ± SD for parametric variables and were compared by a Student's t test, or as median (25th and 75th percentiles) for non-parametric variables and were compared by a Mann–Whitney U test. A univariate general linear model was used to adjust changes by BMI. To compare proportions among groups, Chi-Square test was used. *Reference intervals according to the service of clinical analysis of our hospital were taken into account for the interpretation of clinical laboratory results.

Leukocyte-endothelium interactions. When we assessed cell interactions in diabetic patients and controls, we observed lower leukocyte rolling velocity ($p < 0.001$, Fig. 3a) and increased leukocyte adhesion and rolling flux ($p < 0.001$, Fig. 3b,c) in the latter. Treatment with the mitochondria-targeted antioxidant SS-31 reversed these effects in the leukocytes of T2D patients, triggering a significant increase in leukocyte rolling velocity ($p < 0.05$, Fig. 3a) and reductions in rolling flux ($p < 0.05$, Fig. 3b) and adhesion ($p < 0.01$, Fig. 3c). None of these interactions was influenced by SS-20 treatment (Fig. 3a–c).

Levels of NFκB-p65 and TNFα. Changes in proinflammatory protein expression, measured in terms of NFκB-p65 and TNFα levels, were evaluated in order to determine a possible mechanism by which SS-31 treatment was affecting cell interactions and oxidative stress parameters. A higher peak in NFκB-p65 levels was observed in T2D patients than in healthy subjects ($p < 0.05$, Fig. 4a). The antioxidant SS-31 decreased inflammation in SS-31-treated leukocytes of T2D patients ($p < 0.05$, Fig. 4a), while no differences were observed in controls.

TNFα was activated in the diabetic group and not in healthy subjects ($p < 0.05$, Fig. 4b); in a similar way to NFκB levels, treatment with SS-31 reverted TNFα protein levels to those observed in the control group ($p < 0.05$, Fig. 4b). Treatment with SS-20 had no effect on NFκB-p65 or TNFα protein levels. Representative western blot images are shown for both results.

Discussion

In the present study we have observed that a series of parameters that are altered by T2D - oxidative stress, mitochondrial membrane potential and SIRT1, leukocyte-endothelial interactions and NFκB and TNFα levels in leukocytes - are restored by the mitochondria-targeted antioxidant SS-31, thus highlighting its potential as an agent in the treatment of T2D.

The pathophysiology of T2D involves a series of systemic interrelated alterations including oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation. These alterations are a consequence of the metabolic imbalance that occurs in insulin resistance-related diseases and which alter not only glucose levels, but also lipid metabolism²². In line with this, our cohort of T2D patients displayed an unfavourable metabolic profile characterized by increased insulin resistance index, hyperglycaemia and atherogenic dyslipidemia manifested by reduced HDL-c and increased triglyceride levels with respect to the control group. Furthermore, chronic inflammation was evident in a rise of hs-CRP levels in our T2D patients.

Oxidative stress is a hallmark of diabetes, and hyperglycaemia is the main cause, since mitochondria generate ROS in response to anaerobic glycolysis, a process that is exacerbated in the diabetic state²³. A massive body of research exists regarding the pathological consequences of ROS damage for endothelial, cardiac, and blood cells, which precedes the onset of diabetes-related macro- and microvascular complications^{17,24}. In the present study we have witnessed how leukocytes from T2D patients display features of oxidative stress, including enhanced total and mitochondrial ROS production and decreased GSH content. Furthermore, the mitochondrial membrane potential of leukocytes from T2D patients was inferior to that of control subjects, thus reflecting impaired mitochondrial function. These findings are in accordance with previous reports by our group^{10,25}.

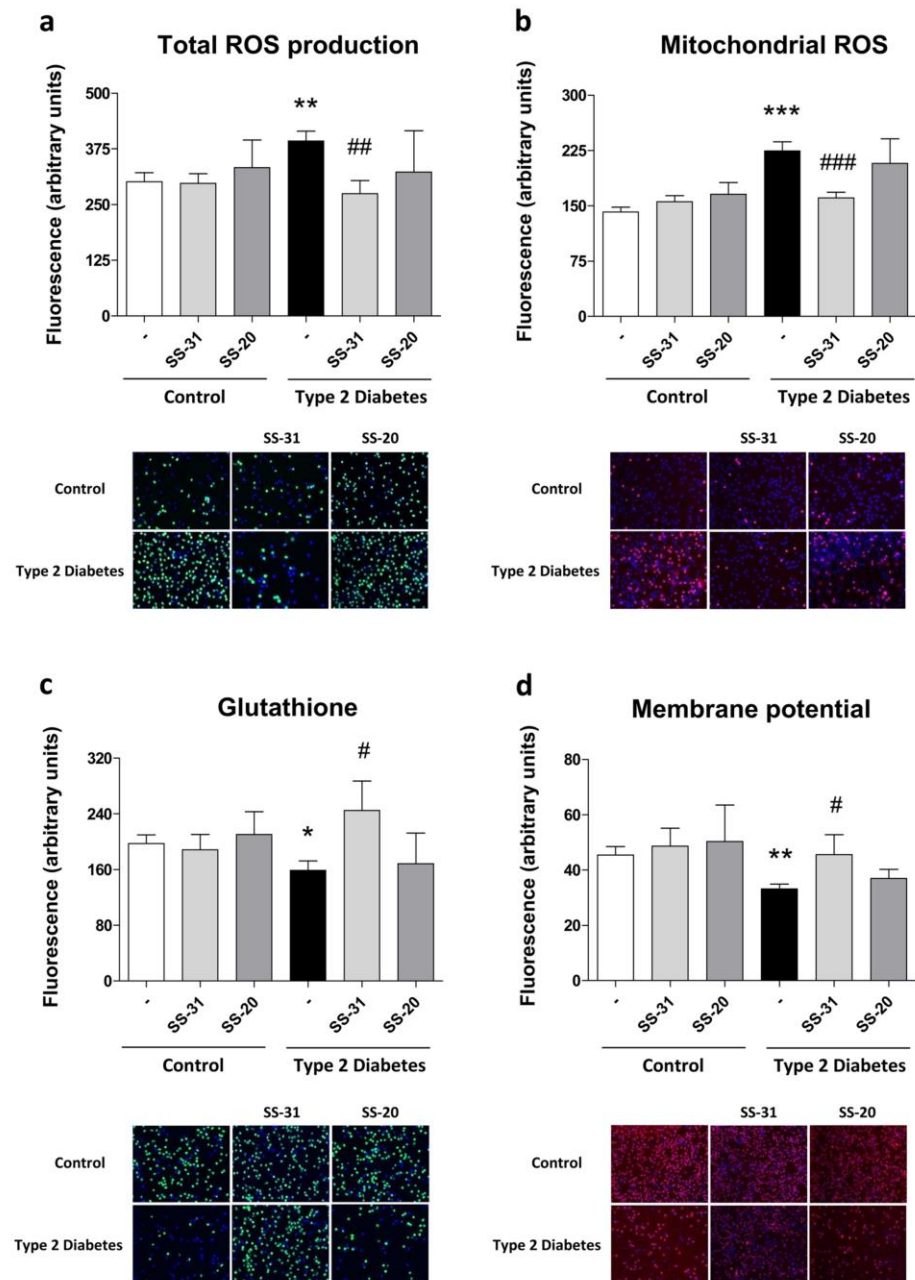


Figure 1. Evaluation of oxidative stress parameters in leukocytes from T2D patients and controls in the absence and presence of SS-31 (30 min, 100 nM) (a) ROS production measured as DCFH-DA fluorescence. (b) Mitochondrial ROS production measured as MitoSOX fluorescence. (c) GSH levels measured as CMFDA fluorescence. (d) Mitochondrial membrane potential measured as TMRM fluorescence. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ with regard to control group # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$ ### $p < 0.001$ vs. non-treated T2D group. All these results are shown together with representative fluorescence microscopy images.

In relation with mitochondrial function, SIRT1 is a key player in the regulation of mitochondrial metabolism⁴ and regulates insulin secretion, adipogenesis and myogenesis. Furthermore, SIRT1 modulates various phases of glucose metabolism in different tissues, including the liver, adipose tissue, pancreas and muscle⁵. In the present

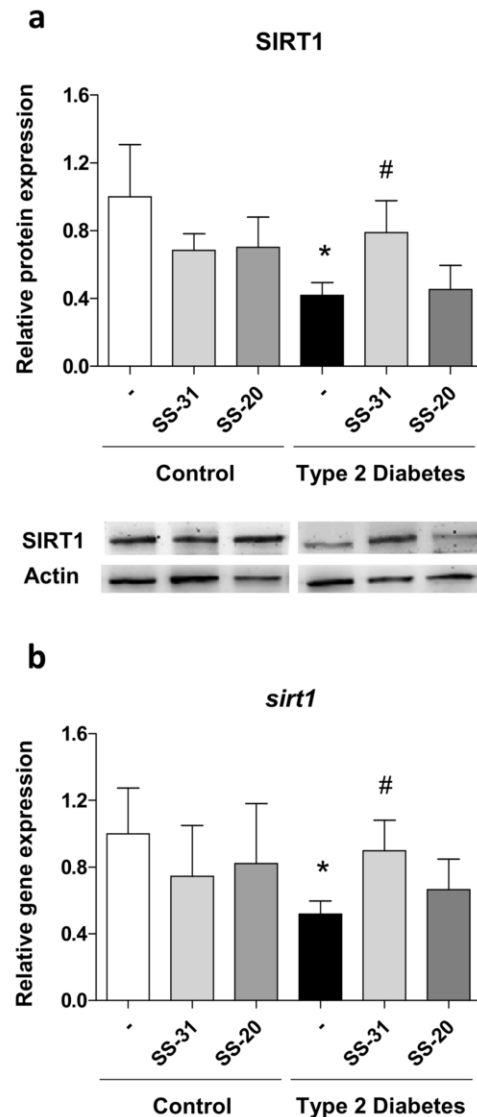


Figure 2. Evaluation of SIRT1 in the absence and presence of SS-31 (30 min, 100 nM) in leukocytes from T2D patients and healthy subjects (a) SIRT1 protein levels. (b) *sirt1* gene expression. * $p < 0.05$ with regard to control group # $p < 0.05$ vs. non-treated T2D group.

study, we have observed a decrease in SIRT1 protein levels and *sirt1* gene expression, suggesting once again an impairment of mitochondrial metabolic function.

Antioxidant therapy for age-related diseases in whose pathophysiology oxidative stress is a crucial player - such as diabetes - has been the subject of extensive research^{26,27}. In particular, SS-31, a small cell-permeable small peptide that targets the inner mitochondrial membrane, has been shown to protect different cell types from oxidative stress by scavenging ROS and reducing mitochondrial ROS production¹⁸. SS-31 concentrates approximately 5,000-fold in mitochondria²⁸ and binds specifically to cardiolipin, an essential phospholipid that preserves the structure and proper function of the inner mitochondrial membrane²⁹. In the present study, we have observed that treatment of T2D patient leukocytes with SS-31 reduced mitochondrial oxidative stress by decreasing ROS production and increasing GSH levels and membrane potential to similar values to those seen in control leukocytes. In line with this, we have previously reported that mitochondria-targeted antioxidants such as mitoquinone (mitoQ) are of therapeutic value in diabetes because they protect against oxidative damage³⁰. Indeed, we have shown that SS-31 increases SIRT1 protein levels and gene expression, suggesting an

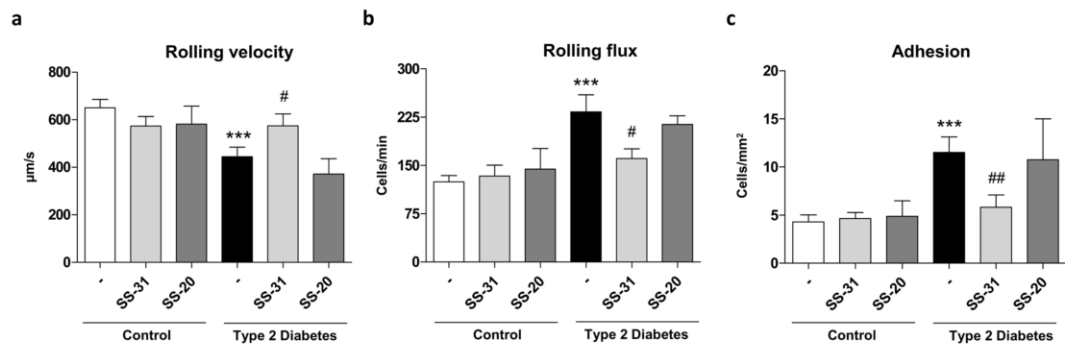


Figure 3. Evaluation of cell interactions in the absence and presence of SS-31 (30 min, 100 nM) in leukocytes from T2D patients and control subjects (a) Rolling velocity ($\mu\text{msecond}^{-1}$) (b) Rolling flux (leukocytes per minute) and (c) Adhesion (leukocytes per square millimetre). *** $p < 0.001$ with regard to control group # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$ vs. non-treated T2D group.

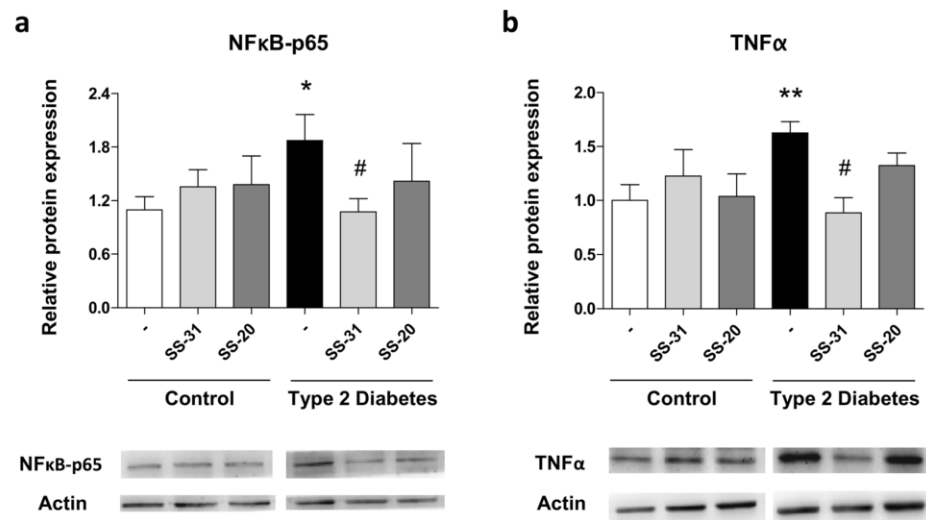


Figure 4. Effects of SS-31 (30 min, 100 nM) on protein expression of NF κ B-p65 and TNF α in type 2 diabetic patients and control subjects (a) Protein levels of NF κ B-p65 and representative WB images (b) Protein levels of TNF α and representative WB images. Control samples and T2D samples derived from the same experiment on the one hand and blots on the other were processed in parallel. ** $p < 0.01$ with regard to control group # $p < 0.05$ vs. non-treated T2D group.

improvement of mitochondrial function. In fact, experimental evidence of SIRT1 overexpression suggests that a decrease in serum insulin and cholesterol occurs in addition to that of adipose tissue volume and obesity-induced insulin resistance³¹.

The cytoprotective mechanisms of SS-31 are well characterized and include ROS scavenging and inhibition of mitochondrial permeability transition, which maintains mitochondrial ATP synthesis and mitochondrial oxygen consumption^{32,33}. In addition, SS-31 inhibits the peroxidase activity of endogenous cyt c, favouring its electron-carrying function³³.

Different preclinical studies endorse the therapeutic potential of SS-31 in a variety of diseases associated with bioenergetic failure³³. In relation with diabetes, Tomas *et al.* demonstrated that transplantation of pancreatic islets pre-treated with SS-31 to diabetic mice rapidly restored normoglycaemia (1 day after transplantation), which was sustained at least 14 days after the intervention¹⁸. Furthermore, it has been reported that SS-31 protects retinal structures during diabetes in a rat model³⁴.

In the present study, we have studied in further depth how the antioxidant properties of SS-31 affect the behaviour of leukocytes of T2D patients during the inflammatory state. To do this, we have evaluated leukocyte-endothelial cell interactions in a parallel flow chamber *in vitro* model that mimics leukocyte traffic

in the bloodstream. Our results reveal that, whereas T2D induces a decrease in leukocyte rolling velocity and an increase in rolling flux and adhesion, treatment of leukocytes with SS-31 restores these parameters. This highlights how SS-31 ameliorates the enhanced leukocyte-endothelial interactions which precede atherosclerosis in T2D. In line with this, SS-31 has been shown to have a beneficial effect on macrophages by preventing their conversion to foam cells, which are the main mediators of atherogenesis³⁵. In addition, it has been reported that SS-31 ameliorates cardiac hypertrophy, diastolic dysfunction and fibrosis in a mice model of hypertensive cardiomyopathy³⁶. The benefits of SS-31 for the cardiovascular system may involve several intracellular pathways, such as the inflammatory signalling cascade, which is closely related to ROS production. In this sense, treatment with SS-31 has been shown to prevent I κ B degradation and to thus inhibit NF κ B activity in TNF α -induced inflammation in myotubes³⁷. Moreover, Hao *et al.* demonstrated that SS-31 inhibits ox-LDL-induced inflammation in macrophages, manifested by reduced protein levels of interleukin 6 (IL-6) and TNF α ³⁵. In accordance with these findings, our data demonstrate that SS-31 treatment decreases NF κ B-p65 and TNF α protein levels in the leukocytes of T2D patients, which are initially higher than in those of healthy subjects. The role of ROS as drivers of NF κ B activation³⁸ is well documented, and antioxidants have been shown to prevent NF κ B activation^{39,40}. In addition, NF κ B itself regulates the expression of a variety of antioxidant genes, highlighting the bidirectional relationship between ROS levels and NF κ B activity⁴¹.

Since NF κ B is a major regulator of pro-inflammatory cytokines, we hypothesize that the aforementioned reduction of NF κ B-p65 protein levels and, as a consequence, proinflammatory cytokine TNF α expression by SS-31 is responsible, at least in part, for the lower adhesiveness of leukocytes in T2D patients through an inhibition of the cytokine-driven leukocyte-endothelial cell interaction.

We should highlight the possible interaction between anti-diabetic medication and the experimental drug as a potential limitation of the study; diabetic patients are under treatment, and so we cannot rule out a possible synergistic effect of these compounds, which needs to be explored in future research. In summary, our results highlight the potential benefits of the mitochondria-targeted antioxidant SS-31 for the leukocytes of T2D patients; namely, it increases SIRT1 levels and reduces oxidative stress, NF κ B pro-inflammatory signalling and proinflammatory cytokine TNF α levels, all of which eventually diminishes leukocyte-endothelial interaction. Our findings suggest that SS-31 can reduce the risk of CVD in T2D patients and should be investigated as a potential new agent to be used in the treatment, not only of diabetes, but of other cardiometabolic disorders.

Methods

Subjects. We recruited 51 T2D patients and 57 voluntary controls adjusted for sex and age from the Service of Endocrinology and Nutrition of University Hospital Doctor Peset (Valencia, Spain). All subjects were informed before signing a written consent form. The Ethics Committee of Clinical Investigation of the University Hospital Doctor Peset approved all protocols (ID: 97/16), and the study was conducted in accordance with the ethical principles of the Helsinki Declaration.

Type 2 diabetes was diagnosed following the criteria of the American Diabetes Association. Subjects were excluded from the study when any of the following criteria was met: autoimmune disease; morbid obesity; history of CVD (as peripheral vascular disease, ischemic heart disease, stroke and chronic disease related to cardiovascular risk); infectious, haematological, malignant, organic, or inflammatory disease; or insulin treatment.

Blood samples were collected under fasting conditions from the antecubital vein in a routine blood extraction. Analytical and anthropometric assessments were determined, including weight (kg), height (m), waist circumference (cm), BMI (kg/m²), and diastolic and systolic BP (mmHg).

Biochemical parameters. Venous blood was extracted into Vacutainer® tubes and centrifuged at 1500 g for 10 min at 4 °C, after which biochemical parameters were evaluated as above mentioned²⁴. To quantify triglycerides, glucose and total cholesterol levels in serum, was employed an enzymatic method. Insulin levels were measured by immunochemiluminescence and homeostasis model assessment (HOMA-IR = [fasting insulin (μU/ml) x fasting glucose (mg/dl)]/405) was used to calculate insulin resistance. An automatic glycohemoglobin analyser (Arkay Inc., Kyoto, Japan) was used to determine the percentage of HbA1c. A Beckman LX-20 autoanalyzer (Beckman Coulter, La Brea, CA, US) was employed to assess high density lipoprotein (HDL) levels, low density lipoprotein (LDL) content was estimated with Friedewald's formula, and high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels were measured by an immunonephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Inc., Newark, DE, USA).

Cells. Citrated blood samples were incubated with dextran (3%) for 45 min in order to isolate human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). The supernatant was dropped over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Barcelona, Spain) and centrifuged for 25 min at room temperature at 650 g. Lysis buffer was added to the erythrocytes remaining in the pellet, which was incubated at room temperature for 5 min and then spun at 240 g for 5 min. Leukocytes were washed twice and resuspended at 37 °C in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich, MO). Scepter 2.0 cell counter (Millipore, MA, USA) was employed to count cells. Each cellular suspension was divided into two samples, one of which was treated for 30 min with 100 nM of SS-31, and the other with SS-20 in identical conditions (these concentrations did not affect the viability of the cells).

Measurement of ROS production, membrane potential and glutathione content. Total and mitochondrial ROS production, membrane potential and glutathione (GSH) content were assessed with a fluorescence microscope (IX81; Olympus, Hamburg, Germany) and the analysis was performed with the static cytometry software "ScanR" (Olympus, Hamburg, Germany).

Leukocytes were resuspended (1×10^6 cells/ml) in HBSS and seeded in 48-well plates in duplicate, after which they were maintained for 30 min in a humidified chamber at 5% CO₂. Cells were then incubated with the

qRT-PCR protocol				
Temperature	95 °C	95 °C	60 °C	Melting
Time	10 min	10 s	30 s	curve
N°. of Cycles	1	40		
Primers				
Target	Direction	Sequence (5'-3')		
<i>Sirt1</i>	Forward	TGGGTACCGAGATAACCTTCT		
	Reverse	TGTTTCGAGGATCTGTGCCAA		
<i>Gapdh</i>	Forward	CGCATCTTCTTTTGGGTCG		
	Reverse	TTGAGGTAATGAAGGGGTCA		

Table 2. Protocol details and primers sequences.

respective fluorescence probe. Total ROS production in leukocytes was evaluated with the fluorescence probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 5×10^{-6} mol/l, 30 min) and mitochondrial superoxide was detected with MitoSOX fluorochrome (5×10^{-6} mol/l, 30 min). GSH content was estimated following incubation with the fluorochrome 5-Chloromethylfluorescein Diacetate (CMFDA, 2.5×10^{-6} mol/l, 30 min). The fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, 5×10^{-6} mol/l, 30 min) was used to assess mitochondrial membrane potential. A total of 12 images per well were recorded, nuclei were visualized with Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, MO), and results were expressed as arbitrary fluorescence units.

Confocal Microscopy. Isolated leukocytes were resuspended (1×10^6 cells/ml) in HBSS and plated in slide (chambered coverslip) with 8 wells and maintained for 30 min in a humidified chamber at 5% CO₂. Then, cells were loaded with the respective fluorochrome for 30 min (MitoSOX, (5×10^{-6} mol/l); TMRM, (5×10^{-6} mol/l); Nonyl acridine orange, NAO (1×10^{-6} to stain mitochondria)) in HBSS, 37 °C. Thereafter, staining solution was replaced with fresh HBSS and cells were visualized. The excitation wavelengths for fluorochromes were 510 for MitoSOX, 548 for TMRM, and 485 for NAO. Emission filters was adjusted to 556–600 nm for MitoSOX, 565–603 nm for TMRM, and 505–540 nm for NAO.

Confocal images were acquired using a Leica TCS-SP8 confocal laser scanning unit (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). The white light laser (WLL) source of the Leica TCS-SP8 perfectly matches the spectral properties of any fluorophore excitable in the visible spectral range. The tuning range covers 470 to 670 nm. Imaging was recorded with a 63x/1.4 oil immersion confocal objective and images for each fluorophore were recorded sequentially to avoid channel spill-over.

A complex I inhibitor (rotenone, 50 μM) was used as a positive control for mitochondrial superoxide production (MitoSOX), and a mitochondrial uncoupling agent (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCP, 25 μM) was used as a positive control for mitochondrial depolarization (TMRM).

Leukocyte-endothelium interaction assays. Adhesion assays were performed using an *in vitro* model with parallel plate flow chamber. Once a human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) confluent monolayer had been harvested from fresh umbilical cords by means of collagenase (1 mg/ml in phosphate-buffered saline; Thermo Fisher Scientific, MA) digestion 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). Next, we placed these coverslips into the bottom of the flow chamber, so that a portion (5×25 mm) of the HUVEC monolayer was exposed, and the flow chamber was setup on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S; Amstelveen, The Netherlands) connected to a video camera (Sony Exware HAD; Koeln, Germany). Leukocyte suspensions were perfused across the endothelial monolayer at a flow rate of 0.36 ml/min. Real time images of the flow-exposed monolayer were recorded for 5 min and analyzed. Leukocyte rolling flux, rolling velocity and adhesion were determined as described elsewhere²⁵.

Western Blot analysis. Leukocytes were incubated for 15 min on ice with a lysis buffer (400 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 20% glycerol, 10 μM Na₂MoO₄ and 0.5% Nonidet P-40) containing protease inhibitors (10 mM β-glycerolphosphate, 10 mM NaF, 10 mM PNP and 1 mM Na₃VO₄) and dithiothreitol 1 mM and centrifuged at 4 °C for 15 min. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, IL, US). Protein samples (25 μg) were resolved by means of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, they were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. We used primary antibodies: anti-NFκB-p65 (phospho S536) rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA), anti-TNFα rabbit polyclonal antibody, anti-SIRT1 rabbit polyclonal antibody (Millipore Iberica, Madrid, Spain) and anti-actin rabbit polyclonal antibody (Sigma Aldrich, Missouri, US). Blots were incubated with the secondary antibody HRP goat anti-rabbit (Millipore Iberica, Madrid, Spain) and were developed for 2 min with supersignal west femto (Thermo Fisher Scientific, IL, US) or ECL plus reagent (GE Healthcare, LC, UK). Chemiluminescence signals were detected with a Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) and analysed by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France), and protein bands were normalized to the expression of actin in the same sample.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Total RNA was extracted from leukocyte pellets using the GeneAll® Ribospin™ kit (GeneAll Biotechnology, Hilden, Germany). RNA concentrations were determined using

Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and an optical density absorption ratio of 260/280 nm between 1.8 and 2.0 confirmed RNA purity. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay was performed with 1 µg of mRNA employing a RevertAid First Strand c-DNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). In the following steps, 1 µl of first-strand cDNA was used. *Sirt1* and *gapdh* (housekeeping internal control) gene expression were measured by qRT-PCR using the KAPA SYBR FAST universal master mix (Biosystems, MA) in a 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies, California, US). Methodological procedure details and primer sequences are shown in Table 2. Relative quantification analysis was achieved using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with Expression Suite software (Life Technologies, California, US).

Statistical analyses. Data analysis was carried out with SPSS 17.0. In the table, the results for parametric variables are expressed as mean \pm SD and median (25th and 75th percentiles) for non-parametric variables. Bar graphs in figures indicate mean \pm SEM. A The Mann-Whitney U test was used for comparisons between 2 groups in non-normally distributed samples, the student's t test was used for normally distributed samples, and the Chi-Square test was used for proportions. Changes in biochemical parameters were analyzed using BMI as a covariate in a univariate general linear model. When evaluating the effects of SS-31 and SS-20, data were compared with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post hoc test. We have considered significant differences when $p < 0.05$.

References

- Zimmet, P., Alberti, K. G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. **414**, 782–787 (2001).
- Engelmann, J. *et al.* Determinants of mortality in patients with type 2 diabetes: a review. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **17**, 129–137 (2016).
- Katsiki, N., Purrello, F., Tsioufis, C. & Mikhailidis, D. P. Cardiovascular disease prevention strategies for type 2 diabetes mellitus. *Expert. Opin. Pharmacother.* **14**, 1–18 (2017).
- Ryall, J. G. The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **15**, 561–566 (2012).
- Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. **434**, 113–118 (2005).
- Feige, J. N. *et al.* Specific SIRT1 activation mimic low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell. Metab.* **8**, 347–358 (2008).
- Szendroedi, J., Phielix, E. & Roden, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 92–103 (2011).
- Ma, W. *et al.* Protective effects of SS-31 on T-BHP induced oxidative damage in 661W cells. *Mol. Med. Rep.* **12**, 5026–5034 (2015).
- Yacizi, D. & Sezer, H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **960**, 277–304 (2017).
- Hernandez-Mijares, A. *et al.* Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free. Radic. Biol. Med.* **50**, 1215–1221 (2011).
- Mohamed, J., Nazratun-Nafizah, A. H., Zariyantey, A. H. & Budin, S. B. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **16**, e132–141 (2016).
- Barzilay, J. I. *et al.* The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly. *Diabetes*. **50**, 2384–2389 (2001).
- Duncan, B. B. *et al.* Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. **52**, 1799–1805 (2003).
- Yi, B. *et al.* Nuclear NF- κ B-p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP-1, RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy. *PLoS One*. **9**, e99633, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099633> (2014).
- Ji, M. H. *et al.* Valproic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*. **36**, 1453–1459 (2013).
- Li, G. M. *et al.* Effects of hydrogen-rich saline treatment on polymicrobial sepsis. *Journal of Surgical Research*. **181**, 279–286 (2012).
- Tousoulis, D. *et al.* Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 667–676 (2013).
- Thomas, D. A. *et al.* Mitochondrial targeting with antioxidant peptide SS-31 prevents mitochondrial depolarization, reduces islet cell apoptosis, increases islet cell yield, and improves posttransplantation function. *Journal of the American Society of Nephrology*. **18**, 213–222 (2007).
- Wu, J. *et al.* Mitochondria-targeted peptide reverses mitochondrial dysfunction and cognitive deficits in sepsis-associated encephalopathy. *Molecular Neurobiology*. **52**, 783–791 (2014).
- Szeto, H. H. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid. Redox. Signal.* **10**, 601–619 (2008).
- Hou, Y. *et al.* Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **310**, F547–559 (2015).
- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C. & Ferrannini, E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. **15**, 318–368 (1992).
- Nishikawa, T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. **404**, 787–790 (1999).
- Hernandez-Mijares, A. *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).
- Rovira-Llopis, S. *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).
- Ylönen, K. *et al.* Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia dietary study. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 1434–1441 (2003).
- Zordoky, B. N., Robertson, I. M. & Dyck, J. R. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochem. Biophys. Acta*. **1852**, 1155–1177 (2015).
- Zhao, K. *et al.* Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 34682–34690 (2004).
- Birk, A. V. *et al.* The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1250–1261 (2013).
- Escribano-López, I. *et al.* The mitochondria-targeted antioxidant mitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biology*. **10**, 200–205 (2016).
- Banks, A. S. *et al.* SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes mice. *Cell. Metab.* **8**, 333–341 (2008).

32. Yang, L. *et al.* Mitochondria-targeted peptides protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2095–2104 (2009).
33. Szeto, H. H. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2029–2050 (2014).
34. Huang, J. *et al.* Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 protects the retinas of diabetic rats. *Curr. Mol. Med.* **13**, 935–945 (2013).
35. Hao, S. *et al.* Mitochondrion-targeted peptide SS-31 inhibited oxidized low-density lipoproteins-induced foam cell formation through both ROS scavenging and inhibition of cholesterol influx in RAW264.7. *Cells. Molecules.* **20**, 21287–21297 (2015).
36. Dai, D. F. *et al.* Mitochondrial targeted antioxidant peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 73–82 (2011).
37. Lightfoot, A. P. *et al.* SS-31 attenuates TNF α induced cytokine release from C2C12 myotubes. *Redox Biol.* **6**, 253–259 (2015).
38. Nakajima, S. & Kitamura, M. Bidirectional regulation of NF κ B by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 162–174 (2013).
39. Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B. & Brasier, A. R. TNF α -induced NF κ B/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cell Signal.* **19**, 1419–1433 (2007).
40. Kim, J. H. *et al.* The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF κ B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF κ B-inducing kinase pathways: role of H₂O₂ in NF κ B activation. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 885–896 (2008).
41. Morgan, M. J. & Liu, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF κ B signalling. *Cell Res.* **21**, 103–115 (2011).

Acknowledgements

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia-CIBERehd) for his editorial assistance, and Rosa Falcon & Carmen Ramirez (FISABIO) for their technical assistance. This study was financed by grants PI16/1083, PI16/0301 and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute, PROMETEOII 2014/035 from the Regional Ministry Education of Valencian Community, and by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”); GV/2016/169 by the Department of Education of the Valencian Regional Government, and unrestricted grant from Menarini S.A. I.E.-L. is recipient of a predoctoral contract from FISABIO (UGP-15-144). N.D.-M., S.L.-D., A.M.M. and Z.A.-J. are recipient of a PFIS contract from Carlos III Health Institute (FI14/00125, FI14/00350, FI17/00126, FI17/00144, respectively). F.I. has a contract from Generalitat Valenciana (GRISOLIAP/2016/015). 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). M.R. and V.M.V. are recipients of contracts from the Ministry of Health of the Valencian Regional Government and Carlos III Health Institute (CP116/00037 and CES10/030, respectively).

Author Contributions

I.E.-L. carried out the experiments and wrote the manuscript. N.D.-M., F.I., S.L.-D., A.M.M., Z.A.-J. performed experiments and reviewed the manuscript. C.B. and S.R.-L. performed statistical analyses and wrote the manuscript. C.B. and M.R. contributed to the discussion. J.R.H. gently donated SS-31 and SS-20 and reviewed the manuscript. V.M.V. raised the hypothesis, planned the study and edited the manuscript. V.M.V. is the guarantor of this work and, as such, have full access to all the data in the study and take responsibility for the contents of the article.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34251-8>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

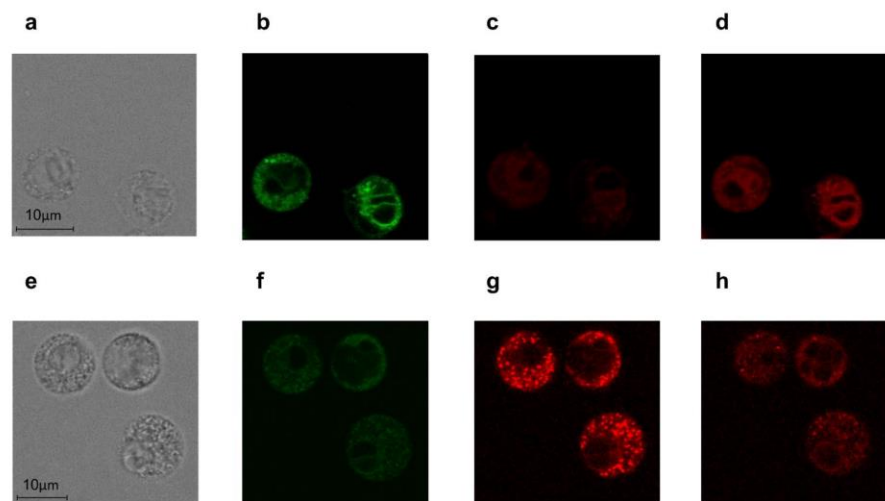
© The Author(s) 2018

The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes

Running title: SS-31 as a novel potential therapy for type 2 diabetes

Irene Escribano-Lopez¹, Noelia Diaz-Morales¹, Francesca Iannantuoni¹, Sandra Lopez-Domenech¹, Aranzazu M de Marañón¹, Zaida Abad-Jimenez¹, Celia Bañuls¹, Susana Rovira-Llopis¹, Jose R Herance², Milagros Rocha^{1,3*}, Victor M Victor^{1,3,6*}

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S1. Representative confocal microscopy images in human leukocytes (a) Images taken by light microscopy (transmission) **(b)** Mitochondrial staining with cardiolipin-sensitive fluorescent dye NAO **(c)** Mitochondrial superoxide assessed as MitoSOX fluorescence **(d)** Stimulated MitoSOX fluorescence after a complex I inhibitor addition (rotenone, 50 μ M) **(e)** Images taken by light microscopy (transmission) **(f)** Mitochondrial staining with cardiolipin-sensitive fluorescent dye NAO **(g)** Mitochondrial membrane potential measured as TMRM fluorescence **(h)** TMRM fluorescence after mitochondrial uncoupling agent supply (CCCP, 25 μ M)

Original Paper

The Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ Modulates Mitochondrial Function and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β Cells Exposed to Hyperglycaemia

Irene Escribano-Lopez^a Celia Bañuls^a Noelia Diaz-Morales^a
 Francesca Iannantuoni^a Susana Rovira-Llopis^a Ramon Gomis^b
 Milagros Rocha^{a,c} Antonio Hernandez-Mijares^{a,d,e} Michael P. Murphy^f
 Victor M. Victor^{a,c,g}

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

^bCiberdem - Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (Idibaps), Barcelona, Spain, ^cCiberehd - Departments of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain, ^dInstitute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain, ^eDepartment of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain, ^fMRC Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, ^gDepartment of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

Key Words

Pancreatic β cells • Oxidative stress • Mitochondrial dysfunction • ER stress • Type 2 Diabetes • MitoQ

Abstract

Background/Aims: Mitochondria-targeted antioxidants such as mitoquinone (MitoQ) have demonstrated protective effects against oxidative damage in several diseases. The increase in reactive oxygen species (ROS) production during glucose metabolism in β cells can be exacerbated under hyperglycaemic conditions such as type 2 diabetes (T2D), thus contributing to β cell function impairment. In the present work, we aimed to evaluate the effect of MitoQ on insulin secretion, oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and nuclear factor kappa B (NF κ B) signalling in a pancreatic β cell line under normoglycaemic (NG, 11.1 mM glucose), hyperglycaemic (HG, 25 mM glucose) and lipidic (palmitic acid (PA), 0.5mM) conditions. **Methods:** We incubated the pancreatic β cell line INS-1E with or without MitoQ (0.5 μ M) under

I. Escribano-Lopez and C. Bañuls contributed equally to this work.

Victor M. Victor

FISABIO-University Hospital Doctor Peset
 Avda Gaspar Aguilar 90, 46017, Valencia (Spain)
 Tel. (+34)961622757, Fax (+34)961622492, E-Mail victor.victor@uv.es

NG, HG and PA conditions. We then assessed the following parameters: glucose-induced insulin secretion, O₂ consumption (with a Clark-type electrode); mitochondrial function, oxidative stress parameters and calcium levels (by fluorescence microscopy); ER stress markers and NFκB-p65 protein levels (by western blotting). **Results:** MitoQ increased insulin secretion and prevented the enhancement of ROS production and O₂ consumption and decrease in GSH levels that are characteristic under HG conditions. MitoQ also reduced protein levels of ER stress markers (GRP78 and P-eIF2α) and the proinflammatory nuclear transcription factor NFκB-p65, both of which increased under HG. MitoQ did not significantly alter ER stress markers under lipidic conditions. **Conclusion:** Our findings suggest that treatment with MitoQ modulates mitochondrial function, which in turn ameliorates endoplasmic reticulum stress and NFκB activation, thereby representing potential benefits for pancreatic β cell function.

© 2019 The Author(s). Published by
Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Introduction

During the onset of type 2 diabetes (T2D), glucose homeostasis is altered due to impairment of the compensatory response of β cells [1]. In addition to the destruction of pancreatic β cells [2, 3], T2D is also associated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction [4-6], with mitochondria representing the main source of reactive oxygen species (ROS) in mammalian cells. In this way, the increase in ROS levels in pancreatic β cells under hyperlipidaemia and hyperglycaemia is one of the key events leading to the impairment of β cell function in T2D [7], although the exact underlying mechanisms are yet to be elucidated.

Under normal conditions, pancreatic β cells generate ATP by metabolizing glucose via glycolysis and through the tricarboxylic acid cycle. During this process, ROS are released and counteracted by antioxidant cell defences. Moreover, β cells modulate blood glucose concentration by releasing insulin, which occurs when the enhanced metabolism of glucose in β cells increases the ATP/ADP ratio and leads to a rapid influx of Ca²⁺, which in turn triggers the release of insulin. The hyperglycaemic (HG) conditions typical in T2D patients lead to increased ROS production [8, 9], which can be exacerbated under hyperlipidaemia; oxidation of free fatty acid-derived acetyl CoA by the TCA cycle and β-oxidation are enhanced, which leads once again to increased ROS production [10]. As pancreatic β cells are highly susceptible to oxidative damage [11], antioxidant therapies that improve or avoid oxidative stress may help ameliorate damage.

Oxidative stress has also been related to endoplasmic reticulum (ER) stress under insulin resistance conditions [12]. In fact, ER stress plays an important role in β cell impairment under both hyperlipidaemic and hyperglycaemic conditions [13, 14], and constitutes a key mediator of β cell apoptosis [15]. Furthermore, it has been reported that ER stress signalling might be triggered by oxidized LDL through the induction of P-eIF2α, ATF6 and IRE1α in vascular cells [16]. In addition, oxidative stress can activate NFκB, leading to changes in proinflammatory gene expression, eventually inducing cardiovascular impairment [17].

Therefore, therapies that decrease mitochondrial impairment, oxidative stress and, consequently, ER stress may be effective in the treatment of T2D and its deleterious effects [4]. For this reason, mitochondria-targeted antioxidants are emerging as potential protective therapies against oxidative damage in cardiovascular diseases, T2D and other conditions [18, 19]. The most widely used mitochondria-targeted antioxidant is mitoquinone (MitoQ), an ubiquinone derivate that specifically targets mitochondria by covalent attachment to a lipophilic triphenylphosphonium (TPP) cation [20, 21] and which can prevent lipid peroxidation. Due to the mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m), this cation is accumulated within mitochondria inside the cells.

Therefore, the aim of the current study was to evaluate the extent of the potentially beneficial effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on insulin secretion, oxidative stress, ER stress and NFκB in the pancreatic β cell line INS-1E - a widely used β-cell surrogate - under normoglycaemic (NG), HG and lipidic conditions.

Materials and Methods*Cell culture and treatments*

The pancreatic β cell line INS-1E was cultured in a humidified chamber with 5% CO₂ in RPMI-1640 medium (Biowest, Nuaille, France) at 11.1 mM glucose supplemented with 5% (vol./vol.), heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 50 μ M β -mercaptoethanol, as previously described [22]. All experiments were performed in cells from passages 40-50. After 4 days of pre-culture in a T75 flask, cells were transferred to T25 flasks or well plates and maintained a further 2 days at 11.1 mM glucose (NG) or exposed to one of the following conditions for 24 hours: high glucose concentration (25 mM, HG) [23] or 0.5 mM palmitate-BSA conjugate [24]. Upon 85% confluency, cells were treated for 3 or 24 hours with 0.5 μ M MitoQ or decyl-TPP in order to evaluate the non-specific effects of MitoQ. Decyl-TPP is similar in hydrophobicity to MitoQ but without the ubiquinol antioxidant moiety [25].

Cell viability assay

Cell viability was assessed using the colorimetric MTT assay Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) after several periods (from 1h to 24 h) of treatment with the mitochondria-targeted antioxidant and decyl-TPP. This colorimetric assay measures the activity of enzymes that reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole, to a purple formazan dye. Absorbance of dissolved formazan crystals was measured in a microplate spectrophotometer reader at 570 nm. Data are displayed as a percentage of absorbance relative to that of the untreated cells.

Glucose-induced insulin secretion (GIIS)

INS-1E β cells were seeded at a density of 0.5×10^6 cells/well in a 24-well plate. Glucose-stimulated secretion was performed after 2 days of culture in RPMI growth medium in the presence or absence of PA 0.5mM (24h). During the last 3h, cells were exposed to 0.5 μ M MitoQ and then washed twice with Hanks' balanced salt solution (HBSS, Sigma Aldrich, Missouri, US). As a basal insulin secretion level, we used HBSS supplemented with 3mM glucose; and as a stimulated level we used HBSS supplemented with 15 mM glucose. The supernatants were then stored for subsequent determination of insulin levels using a rat insulin ELISA kit (Merckodia AB, Uppsala, Sweden). The inter- and intra-assay coefficients of variation were all under 10%. Insulin secretion was normalized to total cellular protein.

Measurement of O₂ consumption

INS-1E β cells were detached by trypsinization, counted with a Scepter 2.0 cell counter (Millipore Iberica, Madrid, Spain), resuspended (5×10^6 cells/mL) in HBSS and placed in a gas-tight chamber. Mitochondrial O₂ consumption was then measured with a Clark-type O₂ electrode (Rank Brothers, Bottisham, U.K.) [26]. An inhibitor of the electron transport chain, sodium cyanide (10^{-3} mol/L), was used to confirm that O₂ consumption was mainly mitochondrial (95-99%).

Membrane potential ($\Delta\Psi_m$), ROS production, glutathione (GSH) and calcium levels measurement

Fluorescence probes tetramethylrhodamine methylester (TMRM; 5×10^{-6} mol/l), MitoSOX (5×10^{-6} mol/l), 2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; 5×10^{-6} mol/l), 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA; 1×10^{-6} mol/l), and (acetyloxy)methyl ester (Fluo-4 AM; 1×10^{-6} mol/l) were employed to estimate $\Delta\Psi_m$, mitochondrial ROS, total ROS, GSH content and calcium levels, respectively. For these measurements, cells were seeded in 48-well plates and incubated for 30 min with the respective fluorescent probe. Fluorescence was then measured by fluorometry using a fluorescence microscope (IX81; Olympus) coupled to the static cytometry software "ScanR" (Olympus). Nuclei were visualized with Hoechst 33342. Measures of fluorescence are expressed in arbitrary units. Experiments were performed in triplicate and 16 images per well were recorded and analysed. All fluorochromes were purchased from Thermo Fisher Scientific, Waltham, US.

Western blotting (WB)

Following the previously described treatments, total protein extracts from INS-1E β cells were obtained by lysing on ice for 15 min with an extraction buffer (400 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.5, 20% Glycerol, 0.1 mM EDTA, 10 μ M Na_2MoO_4 and 0.5%, and Nonidet P-40) containing protease inhibitor mixture (10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM PNP, and 10 mM β -glycerolphosphate) and dithiothreitol 1mM, and by performing centrifugation at 4°C for 15 min. Concentration of the isolated supernatant-containing protein extract was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, IL, US). Twenty-five micrograms of protein were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-GRP78 rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA), anti-P-eIF2 α -pS52 rabbit polyclonal antibody (Life Technologies, California, US), anti-NF κ B-p65 (phospho S536) rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA) and anti-actin rabbit polyclonal antibody (Sigma Aldrich, Missouri, US). Blots were incubated with the secondary antibody HRP goat anti-rabbit (Millipore Iberica, Madrid, Spain) and developed for 2 min with ECL plus reagent (GE Healthcare, LC, UK) or Supersignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, IL, US). The protein signal was detected by chemiluminescence and visualized in a Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). Images were analysed and quantified by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) and protein bands were normalized to the expression of actin in the same sample.

Statistical analysis

Data analysis was performed with SPSS 17.0. Bar graphs show mean \pm SEM. Data were compared with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Results

Cell Viability

The cell viability of MitoQ at 0.5 μ M was similar between 1 and 24h of exposure with respect to untreated cells. However, surprisingly, dTPP showed a significant decrease in cell viability at 10 and 24h, as shown in Supplementary Fig. 1 (all supplementary material available online at www.cellphysiolbiochem.com).

Glucose-induced insulin secretion (GIIS)

Stimulation with 15mM glucose plus treatment with MitoQ significantly increased insulin secretion with respect to stimulation with 3mM glucose under normo-lipidic conditions (Fig. 1). This incremental effect of 15 versus 3 mM glucose was 86.7% when MitoQ was present versus 20.5% in control conditions. In contrast, there were no significant differences in insulin secretion in the lipidic environment.

In addition, in the normo-lipidic environment there was a trend toward a greater release of insulin at 15 mM glucose in the MitoQ versus control group ($p = 0.115$).

Mitochondrial Function

An O_2 electrode was used to monitor the rate of O_2 consumption in INS-1E β cells treated with and without MitoQ. O_2 consumption by the cells was mainly mitochondrial, since addition of sodium cyanide resulted in almost complete (95-99%) inhibition of O_2

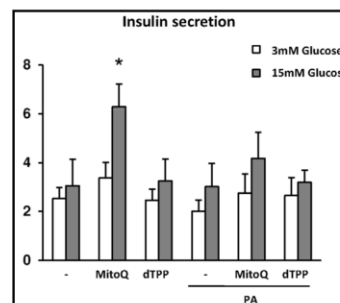


Fig. 1. Effects of MitoQ on insulin secretion in INS-1E cells exposed to glucose or palmitate conditions. Cells were incubated in the presence or absence of 0.5mM palmitate for 24h and then exposed to MitoQ for 3h. Subsequently, they were incubated in HBSS containing 3mM or 15mM glucose. Insulin secretion was evaluated by measuring insulin concentrations in the conditioned medium with an ELISA assay. Data are expressed as insulin secretion in total protein content (mean \pm SEM, $n = 8-11$). * $p < 0.05$ with regard to MitoQ-treated cells in the 3mM glucose condition.

consumption (not shown). Rates of O_2 consumption in β cells, whether treated or not with MitoQ, remained constant under NG. Interestingly, although HG enhanced O_2 consumption rates ($p < 0.05$), MitoQ-treated β cells showed a downward trend under these conditions (Fig. 2A and 2B). In the lipidic environment, the response of MitoQ to O_2 consumption was attenuated with respect to the HG condition, although there was a trend towards an improvement ($p = 0.100$) when we compared the PA condition without vs with MitoQ for 3h. These results did not change when cells were exposed to MitoQ for 24h (Supplementary Fig. 2A). Similarly, no changes were observed with respect to $\Delta\Psi_m$, measured as TMRM fluorescence, in any of the conditions studied (Fig. 2C).

INS-1E β cells exhibited higher levels of MitoSOX oxidation under HG than under NG conditions, which was consistent with an increase in mitochondrial ROS production; however, MitoQ decreased MitoSOX oxidation specifically in cells cultured under HG conditions (Fig. 2D, $p < 0.01$).

None of these oxidative stress parameters was affected by treatment with the control compound decyl-TPP, which has the same mitochondrial-targeting moiety as MitoQ, but lacks an antioxidant effect.

Oxidative stress parameters

Total ROS fluorescence, evaluated by DCFH-DA fluorescence, was significantly higher in untreated cells under HG with respect to NG ($p < 0.05$). Interestingly, MitoQ treatment decreased total ROS ($p < 0.05$) to values similar to those observed under NG conditions, thus revealing a decrease in oxidative stress under HG. MitoQ did not alter total ROS in INS-1E β cells under NG (Fig. 3A).

On the other hand, CMFDA fluorescence, which is proportional to the content of the free thiol form of GSH in INS-1E β cells, decreased under HG ($p < 0.05$) and was restored in the presence of MitoQ ($p < 0.05$), suggesting a protective role. MitoQ did not alter the levels of GSH in NG conditions (Fig. 3B).

These results demonstrate that HG conditions induce oxidative stress in INS-1E β cells and that MitoQ prevents this effect by reducing levels of ROS and preserving antioxidant content. We can also confirm that none of the oxidative stress parameters was affected by treatment with the control compound decyl-TPP.

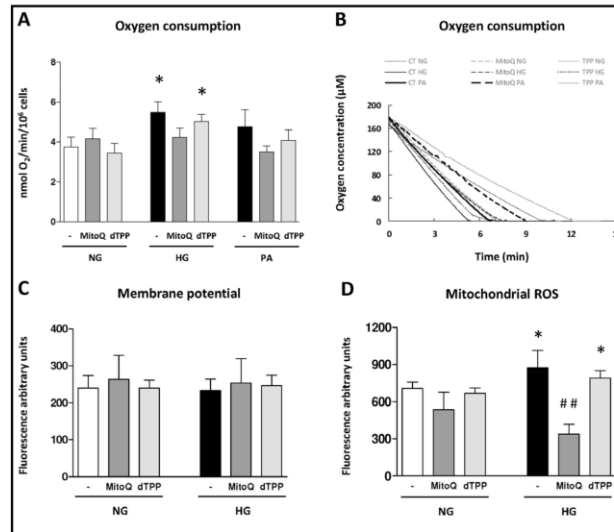


Fig. 2. Evaluation of mitochondrial function in INS-1E cells under normoglycaemia and hyperglycaemia in the presence and absence of MitoQ (3h, 0.5 μ M). (A) Oxygen consumption in a closed respiration chamber measured as $nmol O_2/min/10^6$ cells. (B) Representative traces showing the rate of O_2 consumption in a closed respiration chamber. (C) Mitochondrial membrane potential measured as TMRM fluorescence by fluorometry. (D) Mitochondrial ROS production measured as MitoSOX fluorescence by fluorometry. * $p < 0.05$ with regard to control in normoglycaemia. ** $p < 0.01$ when comparing groups treated and not treated with MitoQ in the hyperglycaemic condition (data represented as mean \pm SEM, $n = 6$).

ER stress

As oxidative stress is closely related to ER stress, we investigated whether the unfolded protein response (UPR) was activated in INS-1E β -cells by assessing protein levels of the ER stress markers GRP78 and P-eIF2 α .

INS-1E β cells cultured under HG displayed enhanced protein levels of the glucose-regulated protein 78 (GRP78) chaperone (Fig. 4A) and phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (P-eIF α , Fig. 4B) with respect to control cells ($p < 0.01$), which pointed to activation of the UPR. These effects under HG conditions were reversed by addition of MitoQ ($p < 0.01$, Fig. 4A and 4B), which did not modify protein levels in NG or PA conditions. However, although there was no significant difference in GRP78 in the lipidic condition, there was a trend ($p = 0.147$) towards a decrease when cells were exposed

Fig. 3. Effects of MitoQ (3h, 0.5 μ M) on oxidative stress parameters in pancreatic β cells under normoglycaemia and hyperglycaemia. (A) ROS production measured as DCFH-DA fluorescence by fluorometry. (B) GSH levels measured as CMFDA fluorescence by fluorometry. * $p < 0.05$ with regard to control in normoglycaemia. # $p < 0.05$ comparing groups treated and not treated with MitoQ in the hyperglycaemic condition (data represented as mean \pm S.E.M, $n = 6$).

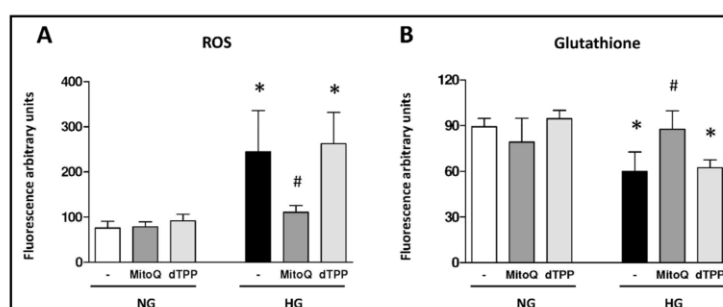
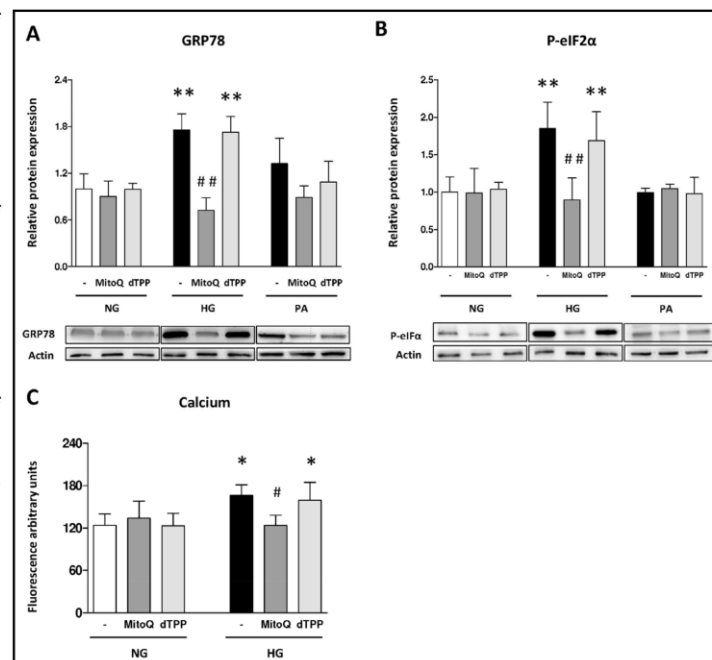


Fig. 4. Evaluation of endoplasmic reticulum stress markers in pancreatic β cells under normoglycaemia, hyperglycaemia and lipidic conditions in the presence and absence of MitoQ (3h, 0.5 μ M). (A) Protein levels of GRP78 and representative WB images. (B) Protein levels of P-eIF2 α and representative WB images. (C) Levels of intracellular calcium measured as Fluo-4 AM fluorescence by fluorometry. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ with regard to control in normoglycaemia. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ when comparing groups treated and not treated with MitoQ in the hyperglycaemia condition (data represented as mean \pm S.E.M, $n = 6$).



to MitoQ. No changes were observed with respect to ER stress markers after 24h exposure to MitoQ in any of the conditions studied (Supplementary Fig. 2B and 2C).

Fluo4-AM fluorescence, employed to measure calcium content, followed a similar pattern to that of ER stress proteins. Whereas calcium levels remained constant in INS-1E β cells with or without MitoQ under NG conditions, there was an increase in intracellular calcium levels in the HG condition that was reverted in the presence of MitoQ, suggesting a preventive effect (Fig. 4C). Decyl-TPP treatment did not affect any of these parameters.

Levels of NF κ B-p65 (phospho S536)

INS-1E β cells showed an increase in NF κ B-p65 levels (Fig. 5, $p < 0.01$) under HG conditions, but MitoQ treatment returned NF κ B-p65 protein levels to those observed under NG conditions (Fig. 5, $p < 0.01$), thus suggesting an anti-inflammatory effect. MitoQ did not modify NF κ B-p65 levels under NG or PA conditions. Decyl-TPP treatment did not affect NF κ B-p65 protein expression. No changes were observed with respect to NF κ B after 24h exposure to MitoQ (Supplementary Fig. 2D).

Discussion

In the present study we demonstrate that HG induces an increase of mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial ROS production, the ER stress markers GRP78 and P-eIF2 α , calcium levels and NF κ B-p65 protein expression in pancreatic β cells, while HG, in contrast, decreases GSH levels in said cells. In addition, we demonstrate the potential beneficial effects of the mitochondrial antioxidant MitoQ, which appears to restore conditions after its administration.

INS-1E is a cell line that displays stable glucose responsiveness and closely mimics the function of normal pancreatic islets. In addition, INS-1E cells are responsive to potentiators of glucose signalling, which makes them useful for studying the mechanisms involved in the regulation of insulin secretion. They are particularly suitable for testing potential therapeutic agents for diabetes treatment, such as mitochondrial-targeted antioxidants [27]. In this sense, our present data demonstrate that MitoQ treatment together with high glucose stimulation significantly increases insulin secretion, suggesting an improvement of β cell function.

HG is closely related to oxidative stress and mitochondrial dysfunction [28, 29]. In fact, we have previously demonstrated that leukocytes from T2D patients present oxidative stress, mitochondrial dysfunction and ER stress [28]. Furthermore, different studies have shown the beneficial effects of mitochondrial antioxidant enzymes under HG, as they protect against oxidative stress [30]. In light of this knowledge, we set out to assess whether mitochondria-targeted antioxidants exert beneficial effects under HG, as previously demonstrated in leukocytes from T2D patients in our laboratory [31]. In fact, MitoQ has been shown to be an effective therapeutic strategy for diabetic nephropathy in the *Ins2^{+/-Akita}* mouse model [18], and promotes the survival and function of pancreatic β cells when they are subjected

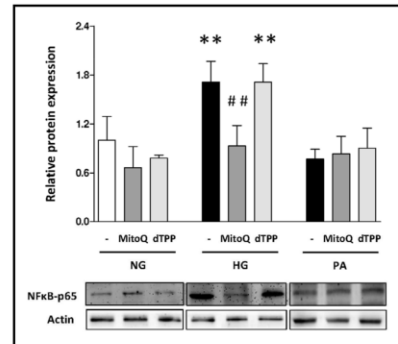


Fig. 5. Evaluation of NF κ B-p65 (phospho S536) protein expression in pancreatic β cells under normoglycaemia, hyperglycaemia and lipidic conditions in the presence and absence of MitoQ (3h, 0.5 μ M). Protein levels of NF κ B-p65 and representative WB images. ** $p < 0.01$ with regard to control in normoglycaemia. ## $p < 0.01$ comparing groups treated and not treated with MitoQ in the hyperglycaemia condition (data represented as mean \pm S.E.M, $n = 6$). Protein expression of NF κ B-p65 (phospho S536) was assessed in the total cell protein extract.

to glucotoxicity and glucolipotoxicity by improving insulin secretion [32]. In addition to the above, we selected MitoQ for the present study due to its biocompatibility and safety at levels whose efficacy has been demonstrated previously, and again in this work. Previous studies have shown that TPP⁺ compounds, such as MitoQ, when used at typical culture concentrations, can affect mitochondrial function depending on the linker group but not on antioxidant properties [33]. Under our conditions, MitoQ did not disrupt mitochondrial function and the decyl-TPP control compound was not protective. It is important to highlight that MitoQ can concentrate rapidly in mitochondria several 100-fold due to its high membrane potential, which helps to prevent lipid peroxidation. MitoQ does not react with H₂O₂ or H₂O₂ radicals, but does so with O₂^{•-}, among other radical oxygen and carbon species. The fact that MitoQ can prevent lipid peroxidation highlights the important role of this compound under oxidative stress conditions [34]. In addition, MitoQ is oriented with the TPP⁺ moiety near the membrane surface, accessing the membrane core to act as a chain-breaking antioxidant and allowing recycling of MitoQ to its ubiquinol form via reduction by complex II [35].

HG and hyperlipidaemia are related to mitochondrial ROS production in pancreatic β cells during T2D [7, 32]. In fact, β cells are particularly susceptible to damage by ROS because of their reduced expression of antioxidant enzymes [36]. In relation to this, the results of the present study show that treatment with MitoQ reduces mitochondrial O₂ consumption under HG conditions, as well as total and mitochondrial ROS, and enhances GSH levels, thus exerting an antioxidant effect. These results are in line with those of previous studies showing that MitoQ reduces ROS and modulates antioxidant activities such as glutathione peroxidase (GPX1) under oxidative stress conditions in propionic acidemia patient-derived fibroblasts [37] and in leukocytes from T2D patients [31]. Moreover, mitochondria-targeted antioxidants have also been shown to maintain mitochondrial morphology, to restore intracellular ATP levels and to increase β cell survival under glucotoxic and glucolipotoxic conditions [32].

It is well known that ER stress and oxidative stress are related [28, 38], which in turn links ER stress to mitochondrial ROS. In this sense, several studies have focused on the contribution of ER stress to the development of insulin resistance and T2D [39, 40]. In this sense, it has been described that autophagy can regulate insulin resistance following ER stress in diabetes [41]. In addition, ER stress has been implicated in apoptosis of pancreatic β cells in a diabetic mouse model [42], and of leukocytes in T2D patients [28, 43]. In addition, Sage et al. [44] showed GRP78, sXBP1 and CHOP levels to be positively correlated with glucose levels in leukocytes from patients with metabolic syndrome. In accordance with these data, our present findings demonstrate that HG enhances levels of ER stress markers such as GRP78 and P-eIF2 α , and intracellular calcium levels. Interestingly, MitoQ treatment reversed these effects, suggesting that this molecule ameliorates the mitochondrial disruption which leads to ER stress. Furthermore, under lipidic conditions, levels of GRP78 were increased, although not significantly, while MitoQ partially reversed this effect. In this sense, it has been described that palmitate causes impaired β -oxidation and citric acid cycle flux, suggesting that this undermined mitochondrial metabolism has important implications for metabolic diseases such as type 2 diabetes [45]. In addition, ER stress/UPR activation plays a critical role in lipid metabolism and homeostasis. ER stress-dependent dysregulation of lipid metabolism may lead to dyslipidemia, insulin resistance, cardiovascular disease, type 2 diabetes, and obesity [46].

It is well known that oxidative stress leads to pro-inflammatory responses. Specifically, it has been reported that an increase of ROS production can activate the pro-inflammatory nuclear factor NF κ B, thus contributing to insulin resistance [47, 48]. In this sense, we have previously reported a significant increase in NF κ B expression in leukocytes of T2D patients [31]. For this reason, we decided to explore whether the antioxidant MitoQ has an effect on p65-NF κ B protein expression in pancreatic β cells under HG and lipidic conditions. Although we have assessed the expression of p65 (phospho S563) in total cell protein extracts rather than in nuclear extracts, our results show an increase in the protein NF κ B-p65 under HG, which was reverted in the presence of MitoQ. This identifies MitoQ as a mitochondrial

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2018;52:186-197

DOI: 10.33594/000000013

Published online: 28 February 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

194

Escribano-Lopez et al.: MitoQ Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress Under Hyperglycaemia

antioxidant capable of modulating, not only oxidative stress and ER stress, but also the inflammatory response. IKK-mediated S536 phosphorylation is critical for activation of the canonical NFκB pathway. In previous research, Day et al. found that IKK-dependent S536 phosphorylation was also required for RelA/p65 nuclear translocation, acetylation in the nucleus, and, thus, NFκB activation induced by HDAC inhibitors [49]. Furthermore, earlier studies have demonstrated that glucose intolerance in obese mice is attenuated after inhibition of the IKKβ/NFκB pathway [50], which suggests this signaling pathway is a central player in the development of T2D. For this reason, we foresee MitoQ treatment as an option for the prevention and/or treatment of insulin resistance and, hence, T2D.

Conclusion

Overall, our findings provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms at work in pancreatic β cells under HG. Importantly, our data show that treatment with MitoQ modulates insulin secretion, mitochondrial function, ER stress and the NFκB signalling pathway, suggesting that this compound exerts beneficial effects that can be taken advantage of to improve pancreatic β cell function.

Abbreviations

ΔΨ_m (mitochondrial membrane potential); CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate); DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate); ER (endoplasmic reticulum); FCS (fetal calf serum); Fluo-4 (AM, (acetyloxy)methyl ester); GIIS (Glucose-induced insulin secretion); GRP78 (glucose-regulated protein 78 chaperone); GSH (glutathione); HG (hyperglycaemia); INS-1E (pancreatic β cells isolated from insulinoma; MitoQ, mitoquinone); MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide); NFκB (nuclear factor kappa B); NG (normoglycaemia); PA (palmitic acid); P-eIF2α (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 alpha); ROS (reactive oxygen species); TMRM (tetramethylrhodamine methylester); T2D (type 2 diabetes); TPP (triphenylphosphonium); UPR (unfolded protein response); WB (western blotting).

Acknowledgements

The authors thank Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance; and Rosa Falcón and Carmen Ramirez (FISABIO) for their technical assistance. This study was financed by grants PI15/1424, PI16/1083, PI16/0301, and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute, PROMETEOII 2014/035 from the Regional Ministry Education of Valencian Community and by the European Regional Development Fund (ERDF "A way to build Europe"); UGP15-193 and UGP-15-220 by FISABIO. I.E.-L. is recipient of a predoctoral contract from FISABIO (UGP-15-144). N.D.-M. is a recipient of PFIS contracts from Carlos III Health Institute (FI14/00125). F.I. is recipient of contract from Generalitat Valenciana GRISOLIAP/2016/015. 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 CPH16/00037, respectively). Work in M.P.M.'s lab is supported by the Medical Research Council UK (MC_U105663142) and by a Wellcome Trust Investigator award (110159/Z/15/Z). Unrestricted grant from Menarini S.A.

Disclosure Statement

The authors declare that no conflicts of interest exist.

References

- ▶ 1 Leahy JL: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2005;36:197-209.
- ▶ 2 Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:102-110.
- ▶ 3 Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:1802-1812.
- ▶ 4 Green K, Brand MD, Murphy MP: Prevention of mitochondria oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004;53:110-118.
- ▶ 5 Sivitz WI, Yorek MA: Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:537-577.
- ▶ 6 Díaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Bañuls C, López-Domenech S, Escribano-López I, Veses S, Jover A, Rocha M, Hernández-Mijares A, Víctor VM: Does metformin protect diabetic patients from oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions? *Antioxid Redox Signal* 2017;27:1439-1445.
- ▶ 7 Nishikawa T, Araki E: Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:343-353.
- ▶ 8 Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA: Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010;2010:453892.
- ▶ 9 Lowell BB, Shulman GI: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005;307:384-387.
- ▶ 10 Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA: High protonic potential activates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997;416:15-18.
- ▶ 11 Gorasia DG, Dudek NL, Veith PD, Shankar R, Safavi-Hemami H, Williamson NA, Reynolds EC, Hubbard MJ, Purcell AW: Pancreatic beta cells are highly susceptible to oxidative and ER stresses during the development of diabetes. *J Proteome Res* 2015;14:688-699.
- ▶ 12 Plaisance V, Brajkovic S, Tenenbaum M, Favre D, Ezanno H, Bonnefond A, Bonner C, Gmyr V, Kerr-Conte J, Gauthier BR, Widmann C, Waeber G, Pattou F, Froguel P, Abderrahmani A: Endoplasmic reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic beta cell function caused by human oxidized LDL. *PLoS One* 2016;11:E0163046.
- ▶ 13 Akerfeldt MC, Howes J, Chan JY, Stevens VA, Boubenna N, McGuire HM, King C, Biden TJ, Laybutt DR: Cytokine-induced beta-cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signalling. *Diabetes* 2008;57:3034-3044.
- ▶ 14 Preston AM, Gurisik E, Bartley C, Laybutt DR, Biden TJ: Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia* 2009;52:2369-2373.
- ▶ 15 Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M: The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008;29:42-61.
- ▶ 16 Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marachet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, Nègre-Salvayre A: Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res* 2009;104:328-336.
- ▶ 17 Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820.
- ▶ 18 Chacko BK, Reily C, Srivastava A, Johnson MS, Ye Y, Ulasova E, Agarwal A, Zinn KR, Murphy MP, Kalyanaraman B, Darley-Usmar V: Prevention of diabetic nephropathy in *Ins2(+/-)* (Akita) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ. *Biochem J* 2010;432:9-19.
- ▶ 19 Apostolova N, Víctor VM: Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal* 2015;22:686-729.
- ▶ 20 James AM, Sharpley MS, Manas ARB, Frerman FE, Hirst J, Smith RAJ, Murphy MP: Interaction of the mitochondria targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases. *J Biol Chem* 2007;282:14708-14718.

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2018;52:186-197

DOI: 10.33594/000000013

Published online: 28 February 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

196

Escribano-Lopez et al.: MitoQ Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress Under Hyperglycaemia

- ▶ 21 Murphy MP, Smith RAJ: Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:629-656.
- ▶ 22 Sarre A, Gabrielli J, Vial G, Leverve XM, Assimakopoulos-Jeannet F: Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. *Free Radic Biol Med* 2012;52:142-150.
- ▶ 23 Brun T, Scarcia P, Li N, Gaudet P, Duhamel D, Palmieri F, Maechler P: Changes in Mitochondrial Carriers Exhibit Stress-Specific Signatures in INS-1E β -cells Exposed to Glucose Versus Fatty Acids. *PlosOne* 2013;8:E82364.
- ▶ 24 Natalicchio A, Biondi G, Marrano N, Labarbuta R, Tortosa F, Spagnuolo R, D'Oria R, Carchia E, Leonardini A, Cignarelli A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F: Long-term exposure of pancreatic β -cells to palmitate results in DREBP-1C-dependent decreases in GLP-1 receptor signalling via CREB and AKT and insulin secretory response. *Endocrinology* 2016;157:2243-2258.
- ▶ 25 Murphy MP: Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:1028-1031.
- ▶ 26 Víctor VM, Rocha M, Bañuls C, Sánchez-Serrano M, Solá E, Gómez M, Hernández-Mijares A: Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3505-3512.
- ▶ 27 Hohmeier HE, Mulder H, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB: Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2000;49:424-430.
- ▶ 28 Rovira-Llopis S, Bañuls C, Apostolova N, Morillas C, Hernández-Mijares A, Rocha M, Víctor VM: Is glycemic control modulating endoplasmic reticulum stress in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid Redox Signal* 2014;21:1759-1765.
- ▶ 29 Leverve XM, Guigas B, Demaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E, Wiernsperger NF: Mitochondrial metabolism and type 2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab* 2003;29:6S88-6S94.
- ▶ 30 Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, Ho YS: Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1191-1196.
- ▶ 31 Escribano-López I, Díaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Martínez De Marañón A, Orden S, Alvarez A, Bañuls C, Rocha M, Hernández-Mijares A, Víctor VM: The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biology* 2016;10:200-205.
- ▶ 32 Lim S, Rashid MA, Jang M, Kim Y, Won H, Lee J, Woo JT, Kim YS, Murphy MP, Ali L, Ha J, Kim SS: Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic β -cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:873-886.
- ▶ 33 Reily C, Mitchell T, Chacko BK, Benavides G, Murphy MP, Darley-Usmar V: Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biol* 2013;1:86-93.
- ▶ 34 Murphy MP, Smith RA: Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:629-656.
- ▶ 35 James AM, Sharpley MS, Manas AR, Frerman FE, Hirst J, Smith RA, Murphy MP: Interaction of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases. *J Biol Chem* 2007;282:14708-14718.
- ▶ 36 Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997;46:1733-1742.
- ▶ 37 Gallego-Villar L, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR, Richard E: Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:457-461.
- ▶ 38 Zhang Y, Soboloff J, Zhu Z, Berger SA: Inhibition of Ca²⁺ influx is required for mitochondrial reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion and cell death in leukemia cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:1424-1434.
- ▶ 39 Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-461.
- ▶ 40 Harding HP, Ron D: Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 2002;51:S455-S461.

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2018;52:186-197

DOI: 10.33594/000000013

Published online: 28 February 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

197

Escribano-Lopez et al.: MitoQ Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress Under Hyperglycaemia

- ▶ 41 Zhang N, Cao MM, Liu H, Xie GY, Li YB: Autophagy regulates insulin resistance following endoplasmic reticulum stress in diabetes. *J Physiol Biochem* 2015;71:319-327.
- ▶ 42 Huang CJ, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Wu X, Soeller WC, Butler PC: Induction of endoplasmic reticulum stress induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1656-E1662.
- ▶ 43 Komura T, Sakai T, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S: CD14 + monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2010;59:634-643.
- ▶ 44 Sage AT, Holtby-Ottenhof S, Shi Y, Damjanovic S, Sharma AM, Werstuck GH: Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:748-755.
- ▶ 45 Haffar T, Akoumi A, Boussette N: Lipotoxic Palmitate Impairs the Rate of β -Oxidation and Citric Acid Cycle Flux in Rat Neonatal Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2016;40:969-981.
- ▶ 46 Basseri S, Austin RC: Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochem Res Int* 2012;2012:841362.
- ▶ 47 Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB: Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse model? *Free Radic Biol Med* 2012;52:46-58.
- ▶ 48 Rains JL, Jain SK: Oxidative stress, insulin signalling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011;50:567-575.
- ▶ 49 Dai Y, Chen S, Wang L, Pei XY, Funk VL, Kramer LB, Dent P, Grant S: Disruption of I κ B kinase (IKK)-mediated RelA serine 536 phosphorylation sensitizes human multiple myeloma cells to histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *J Biol Chem* 2011;286:34036-34050.
- ▶ 50 Benzler J, Ganjam GK, Pretz D, Oelkrug R, Koch CE, Legler K, Stöhr S, Culmsee C, Williams LM, Tups A: Central inhibition of IKK β /NF- κ B signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Diabetes* 2015;64:2015-2027.

Supplementary Material

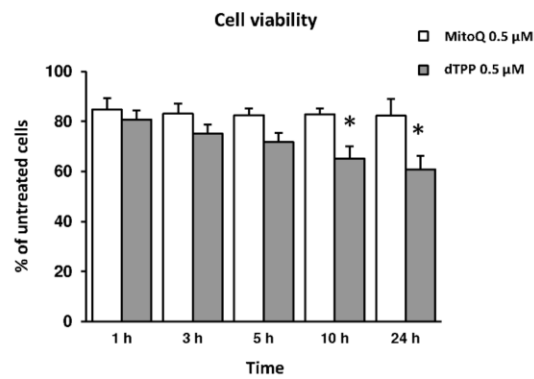
The Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ Modulates Mitochondrial Function and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β Cells Exposed to Hyperglycaemia

Irene Escribano-Lopez^a Celia Bañuls^a Noelia Diaz-Morales^a
Francesca Iannantuoni^a Susana Rovira-Llopis^a Ramon Gomis^b
Milagros Rocha^{a,c} Antonio Hernandez-Mijares^{a,d,e} Michael P. Murphy^f
Victor M. Victor^{a,c,g}

^aService of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain, ^bCiberdem - Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clinic. School of Medicine, University of Barcelona, Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (Idibaps), Barcelona, Spain, ^cCiberehd - Departments of Pharmacology and Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain, ^dInstitute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain, ^eDepartment of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain, ^fMRC Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, ^gDepartment of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

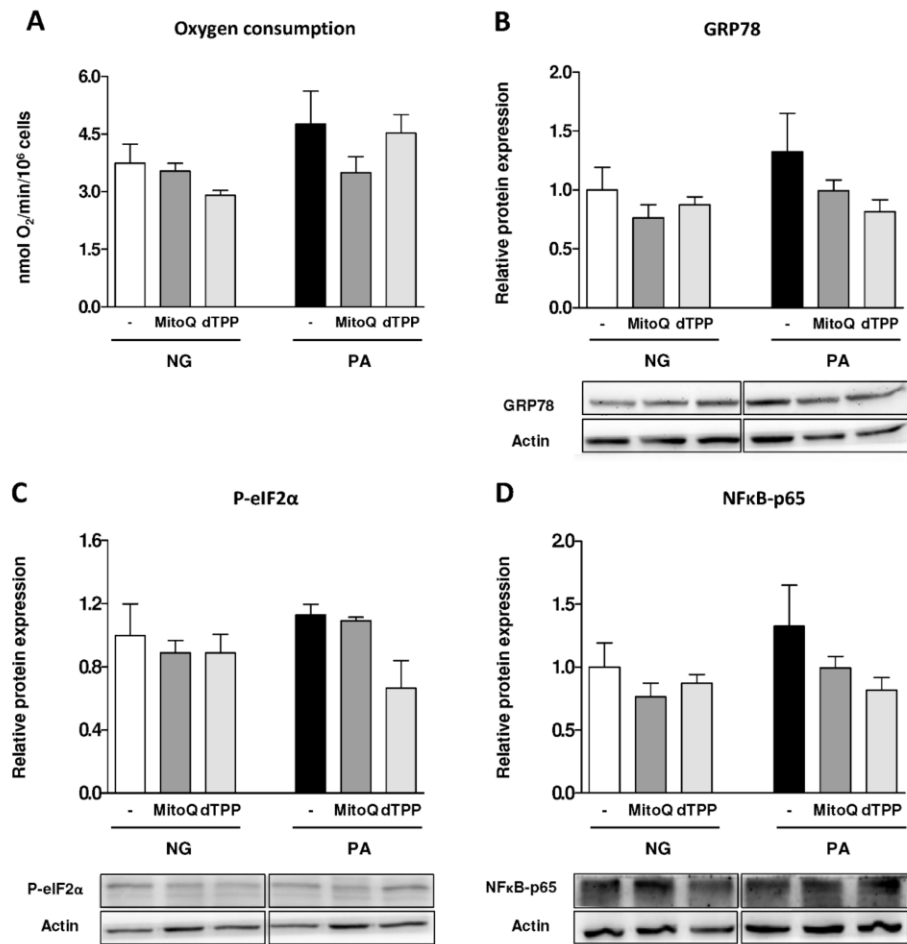
Supplementary Material

Supplementary Figure 1



Supplementary Fig. 1. Cell viability in pancreatic β cells under normoglycaemia in the presence and absence of MitoQ (0.5 μ M) at different time points. Data are displayed as a percentage of absorbance relative to that of untreated cells.

Supplementary Figure 2



Supplementary Fig. 2. Effect of MitoQ (24h) in INS-1E cells exposed to NG or PA conditions (A) Oxygen consumption (B) Protein levels of GRP78 and representative WB images (C) Protein levels of P-eIF2 α and representative WB images (D) Protein levels of NF κ B and representative WB images (data represented as mean \pm S.E.M, n=3-4).

ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ADICIONAL

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

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

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 5,151

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

2. Mauricio, M.D., Guerra-Ojeda, S., Marchio, P., Valles, S.L., Aldasoro, M., **Escribano-Lopez, I.**, Herance, J.R., Rocha, M., Vila, J.M., and Víctor, V.M. (2018). Nanoparticles in Medicine: A Focus on Vascular Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.*

Tipo de publicación: Revisión bibliográfica

Factor de impacto: 4,936

Categoría: CELL BIOLOGY

3. 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)

4. 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)

5. Iannantuoni, F., Diaz-Morales, N., **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)

6. Diaz-Morales, N., Iannantuoni, F., **Escribano-Lopez, I.**, Bañuls, C., Rovira-Llopis, S., Sola, E., Rocha, M., Hernandez-Mijares, A., and Victor, V.M. (2018). Does Metformin Modulate Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Type 2 Diabetic Peripheral Blood Mononuclear Cells? *Antioxid. Redox Signal* 28, 1562-1569.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,530

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

7. Diaz-Morales, N., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., López-Domènech, S., **Escribano-Lopez, I.**, Veses, S., Jover, A., Rocha, M., Hernández-Mijares, A., and Víctor, V.M. (2017). Does metformin protect diabetic patients from oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions? *Antioxid. Redox Signal* 27, 1439-1445.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,530

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

8. Diaz-Morales, N., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., **Escribano-Lopez, I.**, de Marañón, A.M., Lopez-Domenech, S., Orden, S., Roldán, I., Álvarez, A., Veses, S., Jover, A., Rocha, M., Hernández-Mijares, A., and Víctor, V.M. (2016) Are mitochondrial fusion and fission impaired in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxidants & Redox Signaling* 25, 108-115.

Tipo de publicación: Artículo científico

Factor de impacto: 6,530

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

9. 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., Diez, J.L., Rocha, Milagros., Hernande-Mijares, A., and Víctor, V.M. (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)

10. 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)

11. 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)

12. **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

13. 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)

