



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

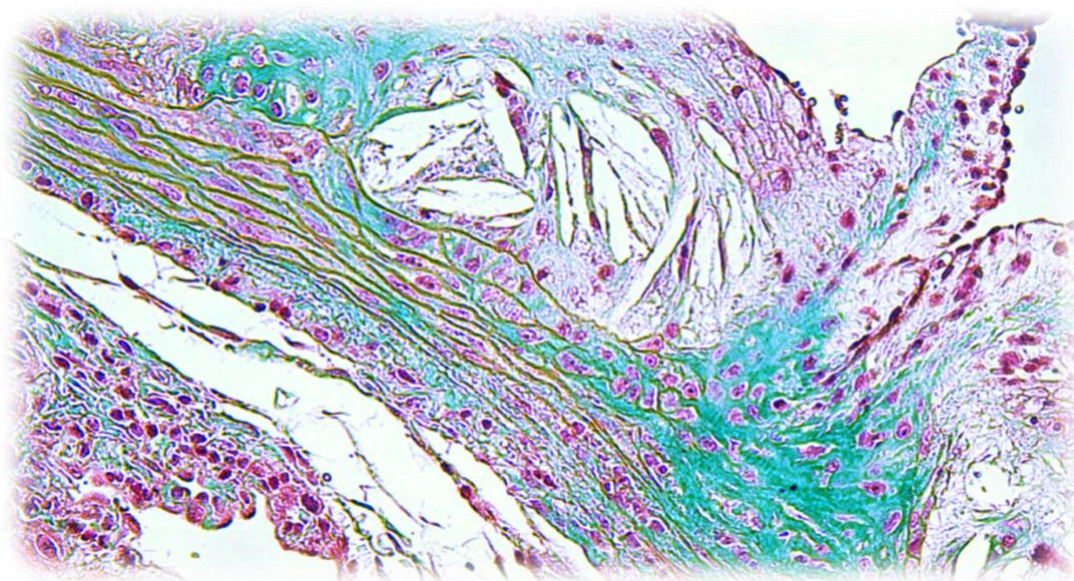


DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Efecto de la dapagliflozina en la aterosclerosis diabética y caracterización de un modelo murino de EHNA inducido por dieta

Tesis doctoral

Alida M. Taberner Cortés



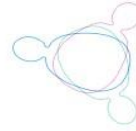
Directora

Dra. Herminia González Navarro

Junio 2021



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

Doctorado en biotecnología

**Efecto de la dapagliflozina en la aterosclerosis
diabética y caracterización de un modelo murino de
EHNA inducido por dieta**

Tesis doctoral

Alida M. Taberner Cortés

Directora

Dra. Herminia González Navarro

Valencia, Junio 2021

Dña. Herminia González Navarro, Investigadora de la Fundación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA.

CERTIFICA

Que el trabajo titulado **Efecto de la dapagliflozina en la aterosclerosis diabética y caracterización de un modelo murino de EHNA inducido por dieta** presentado por Dña. Alida M. Taberner Cortés, licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el INCLIVA bajo su dirección para obtener el grado de Doctor.

Valencia, 25 de junio de 2021

Director:
Herminia González Navarro

*“Por los presentes, por los
ausentes y por los venideros.”*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido fruto de la constancia y del esfuerzo. Y no habría sido posible sin la oportunidad que me brindó mi directora Herminia. Muchas gracias por la paciencia y el apoyo que me has dado cuando ya pensaba que todo estaba perdido y que no lo conseguiría nunca.

Debo agradecerle este trabajo también a Andrea y Ángela. Me habéis enseñado prácticamente todo lo que he aprendido en esta etapa y además habéis compartido conmigo vuestros trucos y consejos. Muchas gracias por ser amigas además de compañeras. No sabéis lo que os echo de menos.

Gracias también a Susana y María. Llevamos menos tiempo juntas, pero ya hemos compartido unas cuantas aventuras en el laboratorio.

Guadalupe, gracias por resolver siempre todas mis dudas en los análisis de citometría. A pesar de que pregunto una y otra vez lo mismo, siempre dispones del tiempo para explicármelo.

Al servicio de animalario, Ana, Eva, Pili y María, entre otros, muchas gracias por facilitar el trabajo con los animales. Gracias también a los servicios de la UCIM por vuestra ayuda en el uso de dispositivos y demás servicios.

Debo darle las gracias también a mis antiguos compañeros y amigos del departamento de Anatomía, a Joana, Ana, Arantxa, Sergio y Eva, sigue siendo un placer encontrarme con vosotros por los pasillos de la facultad. No puedo olvidar tampoco a Vicent y a Luís que siempre me han apoyado y aún hoy lo siguen haciendo.

Gracias a mis tíos que fueron los que me metieron en la cabeza dedicarme a esto y los cuales van a ser lo más orgullosos de mí por conseguirlo.

Gracias a mis amigas y a mis amigos por aguantarme durante todo el proceso que ha sido muy largo.

Gracias a toda mi familia y “no familia” por ayudarme a que esto pudiera ocurrir. Sin vosotros y vuestro apoyo nunca se habría hecho realidad, gracias a los que estáis y a los que ya no.

Y muchas gracias a Lluís, a ti te debo la mitad de este trabajo, porque el tiempo para realizarlo me lo has dado tú. Muchas gracias por estar siempre ahí y por soportarme y ayudarme en todo momento.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG	<i>ATP-binding cassette transporter G</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
ACOX	<i>Acyl-CoA oxidase</i>
ACTA	<i>Actin alpha</i>
AG	Ácidos grasos
Akt	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog kinase</i>
Apo	Apolipoproteína
ARG	Arginasa
AUC	<i>Area under the curve</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
c-apoB	Colesterol apoB
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
c-HDL	Colesterol HDL
ChREBP	<i>Carbohydrate regulatory element binding protein</i>
c-LDL	Colesterol LDL
cMLVs	células del Músculo Liso Vascular

CREB-H	<i>cAMP responsive element-binding protein H</i>
c-Total	Colesterol total
CXCR3	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
CYP7A1	<i>Cytochrome P450 family 7 subfamily a member 1</i>
DA	Dislipidemia aterogénica
DAB	Diaminobencidina
DAGAC	Dieta alta en grasa y alta en colesterol
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DC	Dieta control
DDCM	Dieta deficiente en colina y metionina
DEHNA	Dieta inductora de EHNA
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	<i>Ethilenediaminetetraacetic acid</i>
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteohepatitis no alcohólica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

Acrónimos y abreviaturas

FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FXR	F arnesoid X receptor
GLP	<i>Glucagon like peptide</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
HCC	H epatocarcinoma c elular
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HL	<i>Hepatic lipase</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFNγ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IκB	<i>Inhibitor of κB</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleuquina
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
INSR	<i>Insulin receptor</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>

LCM	<i>L929-cell conditioned medium</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLm	LDL modificadas
LDLr	<i>LDL receptor</i>
LDN	Lipogénesis de novo
LEE	Lámina elástica externa
LEI	Lámina elástica interna
LOX1	<i>Lectin-like ox-LDL receptor-1</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulation factor</i>
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea
MEC	Matriz extracelular
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NEFA	<i>Non-esterified fatty acids</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappaB</i>
NKT	<i>Natural killer T lymphocytes</i>
NO	Nitric oxide

Acrónimos y abreviaturas

NOS	Nitric oxide synthase
OMS	Organización mundial de la salud
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PFA	Paraformaldehído
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
P/S/A	<i>Penicillin/streptomycin/amphotericin B</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RI	Resistencia a insulina
RORC	Related Orphan Receptor C
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGLT	<i>Sodium glucose cotransporter</i>
SGLTi	<i>Sodium glucose cotransporter inhibitor</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>

SRA	<i>Scavenger receptor class A</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
SRI	Síndrome de resistencia a insulina
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STZ	Streptozotocina
TA	Temperatura a mbiente
TG	Triacilgliceroles
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	<i>T helper</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMB	3,3', 5,5' tetramethylbenzidine
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	T reguladores
TTG	Test de tolerancia a la g lucosa
TTI	Test de tolerancia a la insulina
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WT	<i>Wild type</i>

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ABSTRACT	1
RESUMEN	3
RESUM	5
INTRODUCCIÓN	7
1. DIABETES	9
1.1. <i>La diabetes y su incidencia global en la actualidad</i>	9
1.2. <i>La diabetes mellitus tipo 2</i>	10
2. ATEROSCLEROSIS	12
2.1. <i>Incidencia actual de las enfermedades cardiovasculares</i>	12
2.2. <i>Pared arterial: estructura y composición</i>	12
2.3. <i>Alteraciones de la homeostasis de la pared vascular: la aterosclerosis</i>	13
2.4. <i>Mecanismo y patofisiología de la aterosclerosis</i>	14
3. EFECTOS DE DMT2 EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	18
4. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO: ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	20
4.1. <i>Características de la EHGNA</i>	20
5. LOS COTRANSPORTADORES SODIO GLUCOSA COMO DIANA TERAPÉUTICA DE LA DMT2	23
5.1. <i>Estructura de los cotransportadores sodio-glucosa y mecanismo de acción</i>	23
5.2. <i>Desarrollo de los inhibidores SGLT</i>	25
5.3. <i>Dapagliflozina</i>	26
6. MODELOS MURINOS DE ATEROSCLEROSIS, DIABETES Y EHGNA	26
6.1. <i>Deficiencia en apolipoproteína E: modelo de hipercolesterolemia y aterosclerosis</i>	26
6.2. <i>Doble deficiencia en Apoe e Irs2: modelo de aterosclerosis acelerada por DMT2</i>	27
6.3. <i>Modelos de ratón de EHGNA inducida por dieta grasa</i>	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. ESTUDIOS IN VIVO EN RATONES	35
1.1. <i>Ratones, genotipados y dietas</i>	35

1.2.	<i>Medidas metabólicas y ensayos bioquímicos.....</i>	36
1.3.	<i>Análisis histopatológico de tejidos</i>	38
1.4.	<i>Cuantificación de la aterosclerosis</i>	40
1.5.	<i>Caracterización de la placa de ateroma.....</i>	41
2.	CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS INFLAMATORIOS	46
2.1.	<i>Análisis de citoquinas circulantes.....</i>	46
2.2.	<i>Caracterización de las células circulantes en sangre mediante citometría de flujo</i>	46
3.	CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL HÍGADO.....	49
3.1.	<i>Determinación del contenido de triacilgliceroles hepáticos.....</i>	49
3.2.	<i>Determinación celular en hígado mediante citometría de flujo</i>	50
3.3.	<i>Determinación de la fibrosis hepática</i>	51
3.4.	<i>Determinación de la esteatosis hepática</i>	51
3.5.	<i>Determinación del contenido de linfocitos T hepáticos.....</i>	52
4.	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> EN CÉLULAS DERIVADAS DE RATÓN	52
4.1.	<i>Obtención de macrófagos derivados de médula ósea de ratón.....</i>	52
4.2.	<i>Cultivo de macrófagos en medio condicionado y análisis de la secreción de citoquinas..</i>	53
5.	ESTUDIOS <i>EX VIVO</i> EN TEJIDOS DE RATÓN	53
5.1.	<i>Aislamiento de islotes pancreáticos para el análisis de secreción de insulina</i>	53
5.2.	<i>Cultivo de explantes de tejido adiposo para señalización de insulina y análisis proteico.</i>	54
6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT	54
6.1.	<i>Obtención y cuantificación de extractos proteicos.....</i>	54
6.2.	<i>Análisis de expresión proteica con SDS-Page y Western blot.....</i>	55
7.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QPCR).....	56
7.1.	<i>Obtención y cuantificación de extractos de ARN</i>	56
7.2.	<i>Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real.....</i>	57
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	60
	RESULTADOS.....	61
1.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DAPAGLIFLOZINA EN EL METABOLISMO DE RATONES <i>APOE^{-/-}IRS2^{+/-}</i> CON RESISTENCIA A INSULINA Y ATROSCLEROSIS ACCELERADA	63
1.1.	<i>Caracterización metabólica de ratones <i>Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}</i> tratados con dapagliflozina o vehículo</i>	63
1.2.	<i>Efecto de la dapagliflozina en el metabolismo de carbohidratos</i>	66
1.3.	<i>Efecto de la dapagliflozina en el tamaño o estabilidad de la placa aterosclerótica en ratones <i>Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}</i></i>	70
1.4.	<i>Efecto de la dapagliflozina en la inflamación sistémica en ratones <i>Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}</i>.....</i>	74

1.5. Efecto de la dapagliflozina en macrófagos de ratón <i>Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}</i>	77
2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INMUNES EN UN MODELO MURINO DE ESTEATOSIS	79
2.1. Estudio del metabolismo en ratones <i>WT</i> sometidos a una dieta esteatogénica	80
2.2. Estudio de la fibrosis y de la inflamación sistémica en ratones <i>WT</i> sometidos a una dieta esteatogénica.....	82
2.3. Estudio de la expresión génica en ratones <i>WT</i> con una dieta esteatogénica	88
DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXO.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CEBADORES USADOS EN LA PCR PARA EL GENOTIPADO DE <i>APOE</i> E <i>Irs2</i>	35
TABLA 2. CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE PCR	35
TABLA 3. PROTOCOLO DE DESHIDRATACIÓN DE LOS TEJIDOS	40
TABLA 4. REACTIVOS DE TINCIÓN HISTOLÓGICA: HEMATOXILINA/EOSINA	41
TABLA 5. ANTICUERPOS PRIMARIOS EMPLEADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICAS E INMUNOFLUORESCENCIAS	45
TABLA 6. ANTICUERPOS SECUNDARIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICAS E INMUNOFLUORESCENCIAS ..	45
TABLA 7. ANTICUERPOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN CITOMETRÍA DE FLUJO	49
TABLA 8. PROTOCOLO DE DESPARAFINACIÓN Y REHIDRATACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS	49
TABLA 9. PUNTUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NAS	52
TABLA 10. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN WESTERN BLOT	56
TABLA 11. ANTICUERPOS SECUNDARIOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN WESTERN BLOT	56
TABLA 12. CEBADORES EMPLEADOS EN LOS ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MUERTES ATRIBUIDAS A LA DIABETES POR RANGO DE EDAD DEL AÑO 2019.	10
FIGURA 2. EFECTOS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA.	11
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL.	13
FIGURA 4. INICIACIÓN Y PROGRESIÓN DE LA ATROSCLEROSIS.	15
FIGURA 5. TRÍADA LIPÍDICA.	18
FIGURA 6. ESQUEMA DE LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA.	19
FIGURA 7. COMPLICACIONES HEPÁTICAS EN LA EHGNA.	21
FIGURA 8. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE SGLT.	24
FIGURA 9. PESO CORPORAL EN RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	63
FIGURA 10. NIVELES DE GLUCOSA E INSULINA EN ESTADO DE AYUNO EN PLASMA DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	64
FIGURA 11. NIVELES LIPÍDICOS EN PLASMA DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO DURANTE 8 SEMANAS.	65
FIGURA 12. CARACTERIZACIÓN HEPÁTICA DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO DURANTE 8 SEMANAS.	66
FIGURA 13. NIVELES DE GLUCOSA EN PLASMA DURANTE EL TTG DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	66
FIGURA 14. NIVELES DE INSULINA EN PLASMA DURANTE EL TTG DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	67
FIGURA 15. NIVELES DE GLUCOSA EN PLASMA DURANTE EL TTI DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	68
FIGURA 16. NIVELES DE PÉPTIDO C EN PLASMA DURANTE EL TTI DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	69
FIGURA 17. EFECTO DE LA DAPAGLIFLOZINA EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA.	69
FIGURA 18. ANÁLISIS DE LA LESIÓN ATROSCLERÓTICA EN AORTAS ENTERAS DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	70
FIGURA 19. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA LESIÓN ATROSCLERÓTICA EN CORTES TRANSVERSALES DE AORTA DE RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA O VEHÍCULO.	71
FIGURA 20. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA DAPAGLIFLOZINA SOBRE LA COMPOSICIÓN CELULAR DE LA PLACA DE ATROSCLEROMA EN SECCIONES DE AORTA EN RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	72
FIGURA 21. EFECTO DE LA DAPAGLIFLOZINA EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA PLACA DE ATROSCLEROMA EN RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	73
FIGURA 22. EFECTO DE LA DAPAGLIFLOZINA EN LAS CITOQUINAS PLASMÁTICAS EN RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	74

FIGURA 23. CARACTERIZACIÓN DE LOS LEUCOCITOS CIRCULANTES EN SANGRE EN RATONES <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON VEHÍCULO Y CON DAPAGLIFLOZINA.	75
FIGURA 24. ANÁLISIS DE LOS LINFOCITOS CIRCULANTES EN PLASMA DE RATÓN <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	76
FIGURA 25. ANÁLISIS DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE LINFOCITOS TREG EN PLASMA DE RATÓN <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	77
FIGURA 26. NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS DE RATÓN <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	78
FIGURA 27. EXPRESIÓN DE Cd11c Y Cd206 EN MACRÓFAGOS DE RATÓN <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} TRATADOS CON DAPAGLIFLOZINA.	78
FIGURA 28. EFECTO DE LA DAPAGLIFLOZINA SOBRE EL CONTENIDO DE INOS Y ARG1 RATÓN <i>APOE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	79
FIGURA 29. PESO CORPORAL, NIVELES BASALES DE GLUCOSA EN ESTADO DE AYUNO Y PESO DEL HÍGADO DE RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DC O CON DEHNA.	80
FIGURA 30. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DURANTE EL TTG Y EL TTI DE RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DIETA DC O DEHNA.	81
FIGURA 31. NIVELES LIPÍDICOS EN PLASMA DE RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DC O DEHNA DURANTE 16 SEMANAS. ...	82
FIGURA 32. CARACTERIZACIÓN DE LA EHGNA Y FIBROSIS EN RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DEHNA DURANTE 16 SEMANAS.	83
FIGURA 33. CONTENIDO HEPÁTICO DE CÉLULAS INMUNES CD3+ Y DE TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS EN RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DEHNA DURANTE 16 SEMANAS.	84
FIGURA 34. ANÁLISIS DE LOS MACRÓFAGOS DEL TEJIDO HEPÁTICO EN RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DEHNA.	85
FIGURA 35. CARACTERIZACIÓN DE LOS LEUCOCITOS CIRCULANTES EN SANGRE EN RATONES <i>WT</i> SOMETIDOS A DEHNA DURANTE 16 SEMANAS.	86
FIGURA 36. ANÁLISIS DE LOS LINFOCITOS CIRCULANTES EN RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DIETA DEHNA DURANTE 16 SEMANAS.	87
FIGURA 37. ANÁLISIS DE SUBTIPOS DE LINFOCITOS T CD4+ EN RATONES <i>WT</i> ALIMENTADOS CON DIETA DEHNA Y DC DURANTE 16 SEMANAS.	88
FIGURA 38. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS Y DE FIBROSIS EN RATONES ALIMENTADOS CON DEHNA.	89
FIGURA 39. EXPRESIÓN DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES DETERMINANTES DE CÉLULAS INMUNES EN HÍGADO DE RATÓN ALIMENTADO CON DEHNA Y DC DURANTE 16 SEMANAS.	90
FIGURA 40. EXPRESIÓN DE GENES METABÓLICOS EN HÍGADO DE RATÓN <i>WT</i> ALIMENTADO CON DEHNA DURANTE 16 SEMANAS.	91
FIGURA 41. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN HÍGADO EN RATONES ALIMENTADOS CON DEHNA Y DC DURANTE 16 SEMANAS.	92
FIGURA 42. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA GLUCONEOGÉNESIS, LIPOGÉNESIS Y B-OXIDACIÓN EN HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON DEHNA DURANTE 16 SEMANAS.	93

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) increases morbimortality in humans via enhanced susceptibility to cardiovascular disease (CVD) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The study of a more extensive use of existing antidiabetics drugs for the delay of the development of CVD, as well as the more in-depth study of the molecular mechanisms that promote the appearance of NAFLD are of great relevance to reduce in the future the socioeconomic impact of these metabolic diseases.

In this **first part** of the work, the effect of SGLT2i dapagliflozin (DAPA) was investigated in metabolism and atherosclerosis. Sodium-glucose co-transporters inhibitors (SGLT2i) are drugs designed for T2DM treatment to diminish hyperglycaemia by reducing up to 90% of glucose reabsorption in renal convoluted proximal tube. Clinical studies suggest a beneficial action of SGLT2i in heart failure and CVD. To study the effect of DAPA in atherosclerosis under conditions of insulin resistance (IR) *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* mice were used, which display accelerated atherosclerosis induced by insulin resistance. Dapagliflozin treatment of *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* mice, which were fed a high-fat, high-cholesterol diet, failed to modify body weight, plasma glucose or lipid. DAPA treatment showed no effect in the glucose tolerance test despite augmented insulin levels during the test in DAPA-treated mice suggesting the existence of an impairment in insulin secretion. Consistent with these findings, DAPA treatment of *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* isolated pancreatic islets displayed lower glucose-stimulated insulin secretion compared with vehicle-treated islets. Moreover, insulin-signaling experiments showed decreased pAKT activation in *Irs2^{+/-}* DAPA-treated adipose tissue indicating impaired insulin signaling in this tissue. No changes were seen in lesion size, vulnerability or content of macrophages, vascular smooth muscle cells, T cells or collagen. DAPA did not affect circulating inflammatory cells or cytokine levels.

Hence, this study indicates that dapagliflozin does not protect against atherosclerosis in insulin-resistant mice in hypercholesterolemic conditions.

The **second part** of our study focused on the development and characterization of an experimental model of non-alcoholic fatty liver induced by a diet rich in fat (21%) and sugar (41.5%) and with a high content in cholesterol that we called NASHD. Non-alcoholic fatty liver (NAFL) is a metabolic complication that might be caused by different metabolic disorders and frequently associated to fatty tissue dysfunction, IR and T2DM. This disease shows a wide range of manifestations, therefore having a mouse model that mimics the clinical and pathological symptomatology associated with this disease is essential to develop potential therapeutical targets.

The 16 weeks treatment of mice with NASHD produced a decrease in body weight and free fatty acids levels along with an improvement of the insulin sensitivity in mice treated with NASHD. However, NASHD-fed *WT* mice developed an increase in liver weight and a rise in plasmatic

Abstract

markers of liver damage compared to mice fed with control diet (CD). NASHD-fed *WT* mice also developed greater hepatic steatosis, ballooning and fibrosis and a greater NAS score reflecting an advanced state of steatosis or NASH compared to CD-fed *WT* mice. Hepatic inflammation in NASHD-fed *WT* mice was greater showing an increase in T lymphocytes and CD11c proinflammatory macrophages. Though, there was a decrease in total monocytes and circulating inflammatory Ly6C^{hi} plasmatic levels. Plasmatic leucocytes levels in NASHD-fed *WT* mice showed an increase in cytotoxic T lymphocytes, proinflammatory Th1 and Th9 cells and B cells compared to CD-fed *WT* mice. Analysis of hepatic gene expression showed an impairment of the genic expression profile associated to a greater fibrosis with an imbalance of cholesterol, triglycerides and fatty acids synthesis metabolism in NASHD-fed *WT* mice compared to CD-fed *WT* mice.

Our results suggest that *WT* mice on NASHD for 16 weeks produce an advanced NASH model with fibrosis, high levels of inflammation and significant metabolic alterations with body weight loss and an apparent improvement in insulin sensitivity.

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) aumenta la mortalidad en humanos al aumentar el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular (ECV) y de enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA). El estudio de un uso más extendido de fármacos existentes antidiabéticos para el retraso del desarrollo de ECV, así como el estudio más profundo de los mecanismos moleculares que favorecen la aparición de la EHGNA son de gran importancia para reducir en el futuro el impacto socioeconómico de estas enfermedades metabólicas.

En esta **primera parte** de este trabajo, se investigó el efecto del SGLT2i dapagliflozina (DAPA) en el metabolismo y en la aterosclerosis. Los inhibidores de los cotransportadores sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2i) son fármacos diseñados para el tratamiento de la DMT2 reduciendo la hiperglucemia al reducir hasta en un 90% la reabsorción de glucosa en el túbulo contorneado proximal del riñón. Estudios clínicos sugieren que el uso de los SGLT2i produce un efecto beneficioso sobre el fallo cardíaco y la ECV. Para estudiar el efecto de la DAPA en la aterosclerosis en condiciones de resistencia a insulina (RI) se utilizaron ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*, que muestran una aterosclerosis acelerada inducida por RI. El tratamiento con dapagliflozina en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*, alimentados con una dieta rica en grasa y en colesterol, no produjo ningún efecto sobre el peso corporal, los niveles de glucosa en plasma o los lípidos. El tratamiento con DAPA no produjo ningún efecto en la tolerancia a la glucosa, aunque fueron inferiores en los ratones tratados con DAPA durante el test de glucosa sugiriendo la existencia de una alteración en la secreción de insulina. Consistente con estos resultados, el tratamiento con DAPA en islotes pancreáticos aislados de ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* mostraron menor secreción de insulina al ser estimulados con glucosa respecto a los islotes tratados con vehículo. Además, experimentos de señalización de la insulina mostraron una disminución de la activación de AKT en el tejido adiposo de ratones *Irs2^{+/-}* tratados con DAPA indicando una alteración en la vía de señalización de la insulina en este tejido. No se observaron cambios en el tamaño de la lesión aterosclerótica, en la vulnerabilidad de placa o en el contenido de macrófagos, células de músculo liso vascular, células T o colágeno. La DAPA no produjo ningún efecto sobre la inflamación las células inflamatorias circulantes ni en los niveles de citoquinas.

Este estudio indica que la dapagliflozina no protege de la aterosclerosis en ratones con resistencia a la insulina en condiciones hipercolesterolémicas.

La **segunda parte** del estudio se centró en la puesta a punto y la caracterización de un modelo experimental de esteatosis hepática no alcohólica inducida por dieta rica en grasa (21%) y azúcar (41.5%) y con un alto contenido en colesterol (1.25%) que denominamos DEHNA. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es una complicación metabólica que puede ser causada por diversas alteraciones metabólicas y que se asocia con frecuencia a la disfunción del tejido adiposo, la RI y la DMT2. Esta enfermedad presenta gran variabilidad de manifestaciones, por

Resumen

lo que disponer de un modelo de ratón que mimetice la sintomatología clínica y patológica asociados a esta enfermedad es indispensable para poder desarrollar posibles dianas terapéuticas.

El tratamiento de 16 semanas de los ratones con DEHNA produjo una disminución en el peso corporal y en los niveles de ácidos grasos libres junto con una mejora en la sensibilidad a la insulina en los ratones tratados con DEHNA. No obstante, los ratones WT alimentados con DEHNA desarrollaron mayor peso hepático y un aumento en marcadores plasmáticos de daño hepático comparado con ratones alimentados con dieta control (DC). Los ratones WT alimentados con DEHNA también desarrollaron mayor esteatosis, inflamación lobular, degeneración balonizante y fibrosis y mayor puntuación NAS indicando un estadio avanzado de esteatosis o EHNA comparado con los ratones WT alimentados con DC. La inflamación hepática en los ratones DEHNA fue mayor con un incremento en los linfocitos T y en los macrófagos proinflamatorios CD11c. Sin embargo, se produjo una disminución en los niveles de monocitos totales y en los inflamatorios Ly6C^{hi} circulantes en la sangre. El análisis de leucocitos en sangre mostró también un aumento en los linfocitos T citotóxicos, los subtipos T proinflamatorios Th1 y Th9 y los linfocitos B en los ratones alimentados con DEHNA comparado con ratones WT alimentados con CD. El análisis de la expresión génica en hígado mostró una alteración del patrón de la expresión génica asociada a una mayor fibrosis con un desequilibrio del metabolismo del colesterol, de los triglicéridos y de la síntesis de ácidos grasos en los ratones alimentados con DEHNA comparado con ratones WT alimentados con CD.

Nuestros resultados indican que la DEHNA administrada en ratones WT durante 16 semanas genera un modelo de EHNA avanzado con fibrosis, niveles elevados de inflamación y alteraciones metabólicas importantes que cursan con pérdida de peso y una aparente mejora de la sensibilidad a la insulina.

RESUM

La diabetis mellitus tipus 2 (DMT2) augmenta la mortalitat en humans en augmentar el risc de patir una malaltia cardiovascular (MCV) i de malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA). L'estudi d'un us més estès de fàrmacs existents antidiabètics per al retard del desenvolupament de MCV, així com l'estudi més profund dels mecanismes moleculars que afavoreixen l'aparició de la MFGNA son de gran importància per a reduir en el futur l'impacte socioeconòmic d'aquestes malalties metabòliques.

En aquesta **primera part** d'aquest treball, es va investigar l'efecte del SGLT2i dapaglifozina (DAPA) en el metabolisme i en l'aterosclerosi. Els inhibidors dels cotransportadors sodi-glucosa tipus 2 (SGLT2i) son fàrmacs dissenyats per al tractament de la DMT2 reduint la hiperglucèmia en reduir fins en un 90% la reabsorció de glucosa al túbul contornejat proximal del ronyó. Estudis clínics suggereixen que l'ús dels SGLT2i produeix un efecte beneficiós sobre la fallada cardíaca i la MCV. Per estudiar l'efecte de la DAPA en l'aterosclerosi en condicions de resistència a la insulina (RI) es van utilitzar ratolins *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*, que mostren una aterosclerosi accelerada induïda per RI. El tractament amb DAPA en ratolins *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*, alimentats amb una dieta rica en greix y en colesterol, no va produir cap efecte sobre el pes corporal, els nivells de glucosa en pasma o els lípids. El tractament amb DAPA no va produir cap efecte en la tolerància a la glucosa encara que foren inferiors en els ratolins tractats amb DAPA durant el test de glucosa suggerint l'existència d'una alteració en la secreció d'insulina. Consistentment amb aquests resultats, el tractament amb DAPA en illots pancreàtics aïllats de ratolins *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* van mostrar menor secreció d'insulina en ser estimulats amb glucosa respecte als illots tractats amb vehicle. A més a més, experiments de senyalització de la insulina van mostrar una disminució de l'activació d'AKT al teixit adipós de ratolins *Irs2^{+/-}* tractats amb DAPA indicant una alteració de la via de senyalització de la insulina en aquest teixit. No es van observar canvis en la grandària de la lesió ateroscleròtica, en la vulnerabilitat de placa o en el contingut de macròfags, cèl·lules de múscul llis vascular, cèl·lules T o col·lagen. La DAPA no va produir cap efecte sobre la inflamació de les cèl·lules circulants ni als nivells de citocines.

Aquest estudi indica que la dapaglifozina no protegeix de l'aterosclerosi en ratolins amb resistència a la insulina en condicions hipercolesterolèmiques.

La **segona part** de l'estudi es va centrar en la posada a punt i la caracterització d'un model experimental d'esteatosi hepàtica no alcohòlica induïda per una dieta rica en greix (21%) i sucre (41.5%) i un alt contingut en colesterol (1.25%) que denominem DEHNA. La malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) es una complicació metabòlica que pot ser causada per diverses alteracions metabòliques i que s'associa amb freqüència a la disfunció del teixit adipós, la RI i la DMT2. Aquesta malaltia presenta gran variabilitat de manifestacions, pel que disposar d'un model

de ratolí que mimetitze la simptomatologia clínica i patològica associades a aquesta malaltia es indispensable per poder desenvolupar possibles dianes terapèutiques.

El tractament de 16 setmanes dels ratolins amb DEHNA va produir una disminució en el pes corporal i en els nivells d'àcids grassos lliures junt amb una millora en la sensibilitat a la insulina en els ratolins tractats amb DEHNA. No obstant això, els ratolins *WT* alimentats amb DEHNA van desenvolupar major pes hepàtic i un augment en marcadors plasmàtics de dany hepàtic comparat amb ratolins alimentats amb dieta control (DC). Els ratolins *WT* alimentats amb DEHNA també van desenvolupar major esteatosi, inflamació lobular, degeneració balonitzant i fibrosi i major puntuació NAS indicant un estadi avançat d'esteatosi o EHNA comparat amb els ratolins *WT* alimentats amb DC. La inflamació hepàtica en els ratolins DEHNA va ser major amb un increment en els limfòcits T i en els macròfags proinflamatoris CD11c. No obstant això, es va produir una disminució en els nivells de monòcits totals i en els inflamatoris Ly6C circulants en sang. La anàlisi de leucòcits en sang va mostrar també un augment en els limfòcits T citotòxics, els subtipus T proinflamatoris Th1 i Th9 i els linfòcits B en els ratolins alimentats amb DEHNA comparat amb ratolins *WT* alimentats amb DC. La anàlisi de l'expressió gènica en fetge va mostrar una alteració del patró de l'expressió gènica associada a una major fibrosi amb un desequilibri del metabolisme del colesterol, dels triglicèrids i de la síntesi d'àcids grassos en els ratolins alimentats amb DEHNA comparat amb ratolins *WT* alimentats amb DC.

Els nostres resultats indiquen que la DEHNA administrada en ratolins *WT* durant 16 setmanes genera un model d'EHNA avançat amb fibrosi, nivells elevats d'inflamació i alteracions metabòliques importants que cursen pèrdua de pes i una aparent millora de la sensibilitat a la insulina.

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes

1.1. La diabetes y su incidencia global en la actualidad

La diabetes es una enfermedad crónica asociada con múltiples complicaciones y un riesgo elevado de muerte prematura. En la actualidad 422 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad siendo su incidencia en España del 10.5%, por lo que es considerada una pandemia global (datos de la Organización Mundial de la Salud). Además, se pronostica que será desarrollada por un tercio de las personas a lo largo de su vida [1].

Se ha estimado que 4.2 millones de muertes en individuos adultos de 20-79 años son debidas a esta alteración metabólica y a las complicaciones que acaban desarrollando, lo cual conlleva a una duplicación en la mortandad de este tipo de pacientes y a disminuir su esperanza de vida en 6-7 años (IDF Diabetes Atlas).

Bajo el término de diabetes mellitus se engloban las enfermedades metabólicas caracterizadas por unos niveles elevados de glucosa en sangre resultantes de deficiencias en la secreción o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica que se produce en el transcurso de esta patología resulta en alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, asociándose a daños en órganos a largo plazo y a disfunción y fallo en sistemas, tales como el renal o el cardiovascular [2].

De los subtipos de diabetes los que presentan una mayor incidencia en la población son la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y el tipo 2 (DMT2).

La DMT1 constituye alrededor del 10% de casos conocidos de diabetes y puede afectar a cualquier rango de edad, aunque normalmente se desarrolla en niños o adolescentes. Este subtipo se caracteriza por una carencia absoluta de insulina debido a una reacción autoinmune de origen genético o viral que produce la destrucción de las células β pancreáticas. Las personas que padecen DMT1 sufren de una afección denominada insulinitis en la cual se produce la infiltración de linfocitos T activados en los islotes de Langerhans del páncreas, lo cual va produciendo un agotamiento gradual de células β . La sintomatología se inicia abruptamente cuando se ha producido la destrucción de más del 80% de las células β pancreáticas y el organismo no puede responder de forma adecuada a la ingesta de glucosa. Es por ello, que los pacientes de DMT1 requieren de un tratamiento insulínico que restaure el control metabólico.

La diabetes tipo 2 supone el 90-95% de los pacientes diabéticos y, por lo general, se desarrolla gradualmente, sin la aparición de síntomas evidentes. Estos pacientes presentan una combinación de resistencia a la insulina (RI) y células β disfuncionales, sin ser necesario inicialmente un tratamiento con insulina para controlar el metabolismo ya que las alteraciones metabólicas observadas en la DMT2 son más leves que las descritas para la DMT1. No obstante,

Introducción

más del 90% de los pacientes de DMT2 acaban requiriendo insulino terapia para controlar la hiperglucemia y mantener la hemoglobina glicosilada dentro de los valores normales [3,4].

El estudio de la patogenia de esta alteración metabólica puede ayudar a realizar un diagnóstico correcto de esta enfermedad lo cual permitiría la identificación de aquellos pacientes con un riesgo elevado a sufrir una muerte precoz o a desarrollar complicaciones microvasculares y cardiovasculares, así como también disminuir los altos costes económico-sociales asociados a ella.

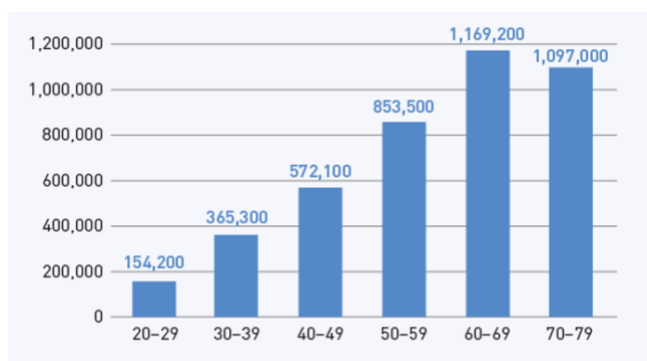


Figura 1. Muertes atribuidas a la diabetes por rango de edad del año 2019. Figura adaptada del Diabetes Atlas 9th ed (International Diabetes Federation) [3]

1.2. La diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad caracterizada por incremento de los niveles de glucosa en sangre a causa de la disfunción de las células β pancreáticas, RI en los órganos diana y deterioro relativo de la secreción de insulina [5].

La enfermedad se detecta por medio de pruebas sistemáticas, ya que la DMT2 se desarrolla de forma gradual e inicialmente los pacientes no muestran una sintomatología evidente. El criterio usado para diagnosticar la DMT2 se basa en los niveles de glucosa en plasma [6]:

- Glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl.
- Glucemia ≥ 200 mg/dl a las 2 horas de una sobrecarga oral de glucosa de 75 g.
- Glucemia al azar ≥ 200 mg/dl.
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6.5\%$.

La RI es una característica típica de la patogénesis de la DMT2 que se define como la pérdida de sensibilidad a la insulina en los tejidos efectores como el hígado, el tejido adiposo o el músculo y que antecede al desarrollo de la enfermedad. Esta pérdida conduce a una deficiencia en la cascada de señalización de la insulina que afecta a la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana y a una disminución en la internalización de la glucosa. Como mecanismo compensatorio, las células β pancreáticas aumentan la producción de la hormona la cual

mantiene los niveles de glucosa en sangre en estadios iniciales, produciendo una hiperinsulinemia (Figura 2) [7].

En condiciones normales, la insulina inhibe la gluconeogénesis por parte del hígado, pero la RI conduce a la inhabilitación de la hormona sobre el control enzimático del proceso, contribuyendo a un incremento en la producción de glucosa por parte del hígado que se manifiesta inicialmente como intolerancia a la glucosa. La insuficiente compensación por parte de la célula β y la producción de glucosa hepática pueden conducir a elevados niveles de glucosa sostenidos en el tiempo e hiperglucemia. La hiperglucemia crónica acaba produciendo *glucotoxicidad* caracterizada por el deterioro de los gránulos insulinosectores de las células β pancreáticas y la disminución de captación de glucosa por parte de músculo y tejido adiposo cuyo resultado es el establecimiento de la hiperglucemia y la RI propias de la DMT2 [8–10].

La RI en el tejido adiposo tiene efectos perjudiciales. Así el fallo en la señalización de la insulina aumenta la lipólisis mediada por lipasas sensibles a hormonas por parte del tejido adiposo liberando ácidos grasos libres no esterificados (NEFA, del inglés *Non-Esterified Fatty Acids*) como fuente alternativa de energía.

La lipotoxicidad causada por el acúmulo de NEFA en diferentes tejidos como el hígado, músculo o páncreas, así como la RI causada por un defecto de la señalización de la insulina conducen a la activación de vías inflamatorias, disfunción celular y lipoapoptosis que se observan en pacientes de DMT2 [11–13].

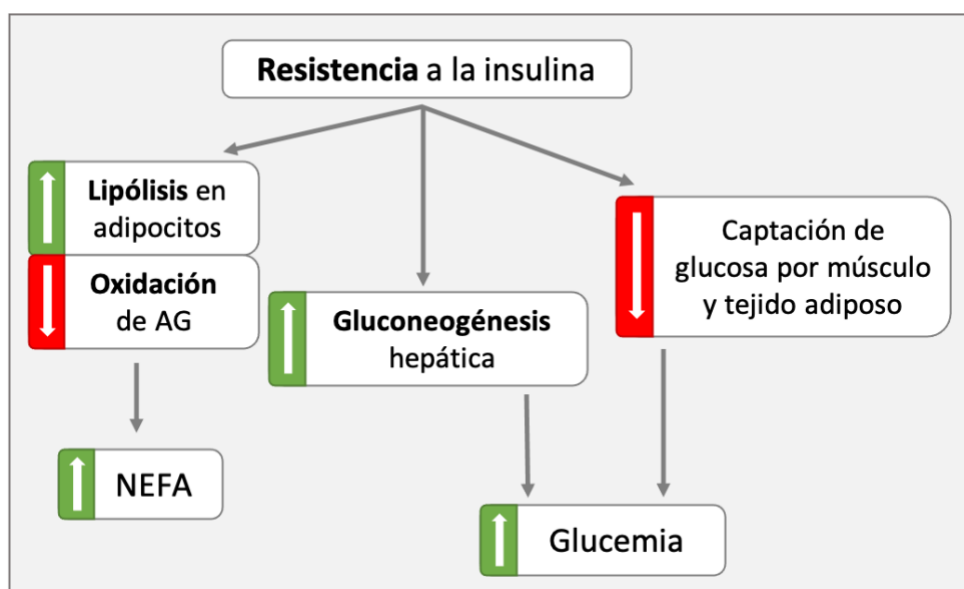


Figura 2. Efectos de la resistencia a la insulina. AG: ácidos grasos, NEFA: ácidos grasos no esterificados (adaptación de Lippincott's 7th ed) [4]

La hiperglucemia produce un incremento de las secreciones por parte del tejido adiposo que conduce a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias por parte de macrófagos activados, así como también a una mayor síntesis de leptina y una menor síntesis de adiponectina, proteínas con efecto proinflamatorio y antiinflamatorio, respectivamente. Siendo el balance neto una inflamación crónica de bajo grado que resulta en RI [4].

2. Aterosclerosis

2.1. Incidencia actual de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causas de mortandad en todo el mundo, considerándola la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad no transmisible que provoca un 37% de las defunciones de personas menores de 70 años (*Fuente: Organización Mundial de la Salud*).

Según la OMS, se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas debido a ECV, siendo la causa de estas enfermedades una combinación de factores de riesgo tales como la hipertensión arterial, la obesidad, el tabaquismo, el consumo nocivo de alcohol, la diabetes y la hiperlipidemia.

En el Atlas presentado por la Sociedad Europea de Cardiología se calculó una incidencia de aproximadamente 11 millones de nuevos casos de ECV en los 47 países miembros en 2015, incremento que era mayor en mujeres que en hombres (5.7 millones de casos frente a 5.3 millones). De los 3.8 millones de las defunciones ocurridas cada año entre los países miembros debidos a ECV, la cardiopatía isquémica era la principal causa responsable del 20% de los fallecimientos, seguido del ictus (11%) [14].

La principal causa de ambas patologías es una complicación aguda de un proceso lento y crónico, la aterosclerosis que se desarrolla en la pared vascular de las arterias.

2.2. Pared arterial: estructura y composición

Las tres capas que forman la estructura la pared arterial son: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (*Figura 3*), las cuales pasamos a desarrollar brevemente:

- Túnica íntima: monocapa de células endoteliales que forma la estructura más interna de la pared vascular que reviste arterias, venas y capilares sanguíneos. Este revestimiento endotelial descansa sobre su membrana basal y una capa de tejido conectivo laxo en la que se entrelazan fibras de colágeno y elásticas y conocida como subendotelio. El endotelio presenta diversas funciones en base a su localización y se conoce su

implicación en la supresión de las células de la capa media con la finalidad de evitar su crecimiento y interrupción de la función vascular [15].

- **Túnica media:** es la capa intermedia compuesta por una serie de capas de células de músculo liso vascular (cMLVs) que se disponen concéntricamente a la luz del vaso y que producen gran parte de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular como proteoglicanos, elastina y colágeno.
- **Túnica adventicia:** capa más externa de la pared del vaso constituida por fibras de colágeno en disposición longitudinal y unas pocas fibras elásticas, en la cual pueden aparecer fibroblastos, macrófagos, terminaciones nerviosas y microvascularización.

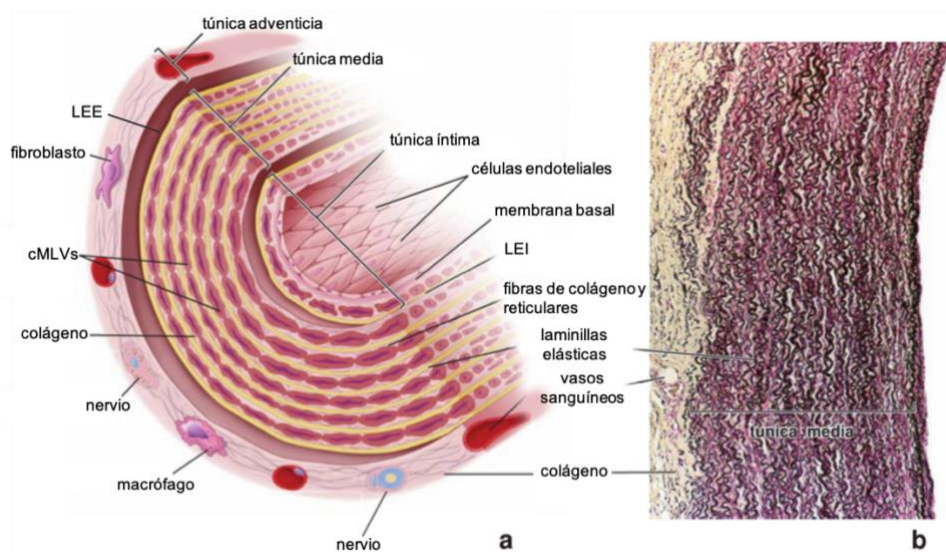


Figura 3. Estructura de la pared arterial. (a) Diagrama de una arteria elástica y los elementos extracelulares que la componen. La capa más externa es la túnica adventicia compuesta por una red de fibras de colágeno, fibras elásticas y fibroblastos. Por debajo de esta capa se encuentra la túnica media formada principalmente por cMLVs y delimitada por las láminas elásticas externa (LEE) e interna (LEI). La capa que reviste la luz del vaso se denomina túnica íntima y está constituida por una capa de células endoteliales que, junto con tejido conjuntivo, constituye una barrera selectiva permeable a sangre y tejidos. (b) Fotografía al microscopio de una sección de aorta humana teñida con la tinción de fucsina-resorcina de Weigert para las fibras elásticas (Adaptación de Ross & Pawlina, 7th ed) [16]

2.3. Alteraciones de la homeostasis de la pared vascular: la aterosclerosis

El principal proceso fisiopatológico subyacente en la ECV es la aterosclerosis, un desorden crónico progresivo del lecho vascular que se desarrolla en las arterias de medio y gran calibre. Esta alteración de la pared arterial se caracteriza por un proceso inflamatorio que se inicia principalmente en zonas en donde el flujo laminar de la sangre está alterado [17].

La aterosclerosis hace referencia a la acumulación de material lipídico y fibroso en el subendotelio vascular que, con el tiempo, puede conducir a un estrechamiento de la luz del vaso produciendo una disminución del flujo a los tejidos. Las placas ateroscleróticas o ateromas que

no generan una obstrucción que limita el flujo sanguíneo pueden evolucionar hacia placas complejas e inestables desencadenando procesos como la erosión o rotura de la placa produciendo trombosis vasculares *in situ* o embolias en sitios distantes [18].

Existe evidencia de la importancia de la túnica íntima y del sistema inmune en esta patología. Así, cambios cualitativos en la monocapa de células endoteliales que reviste la superficie interna vascular conducen a la creación de gradientes de moléculas quimioatrayentes y a la expresión de moléculas de adhesión que retienen leucocitos en su superficie (Figura 4). El reclutamiento y migración de leucocitos por el endotelio activado y la acumulación de lípidos en el subendotelio vascular conduce a la formación de células espumosas. Este proceso puede culminar en el desarrollo de un núcleo necrótico rico en lípidos que junto con un ambiente inflamatorio puede aumentar el riesgo a desarrollar un fenotipo de placa aterosclerótica inestable [17].

2.4. Mecanismo y patofisiología de la aterosclerosis

La aterogénesis hace referencia al desarrollo de la placa aterosclerótica que se produce en el revestimiento interno de las arterias. La patogénesis de la aterosclerosis se desarrolla en tres etapas: iniciación, progresión y pérdida de estabilidad de placa.

2.4.1. Iniciación de la activación endotelial e inflamación

La iniciación de la aterosclerosis se produce como consecuencia de la activación y posterior disfunción de la superficie endotelial que conduce a la expresión de señales que generan un incremento de la permeabilidad vascular de los leucocitos a las capas subyacentes. Muchos autores consideran que la activación del endotelio se debe a múltiples factores, tales como variaciones en el flujo sanguíneo, dislipidemia o respuesta inflamatoria mal adaptativa. Sin embargo, y a pesar de la falta de pruebas rigurosas, la primera diana terapéutica y factor causal de este proceso patológico es la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés, *Low Density Lipoproteins*) en el espacio subendotelial (Figura 4) [18].

Las células endoteliales activadas producen moléculas de adhesión como las selectinas E y P, moléculas de atracción quimiotáctica como MCP1 (del inglés, *Monocyte Chemotactic Protein-1*) y moléculas de adhesión celular vascular como VCAM-1 (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) e ICAM-1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule-1*). Los monocitos se adhieren a la capa de células endoteliales, migrando al espacio subendotelial. Debido a la activación de diversos patrones de reconocimiento molecular como los PAMP (del inglés, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) y los DAMP (del inglés, *Damage Associated Molecular Patterns*), de la acción de citoquinas como el TNF α (del inglés, *Tumor Necrosis Factor α*) y las interleuquinas IL1 e IL6, los monocitos proliferan y se diferencian a macrófagos. Por otro lado, en situaciones de disfunción endotelial y niveles medios o elevados de LDLs, éstas son retenidas en el

subendotelio y experimentan modificaciones como la oxidación o acetilación formando partículas de LDL modificadas (LDLm). Las LDLm son reconocidas por los macrófagos a través de sus receptores “basura”, principalmente CD36 (del inglés, *cluster of differentiation 36*), SRA (del inglés, *scavenger receptor A*) y LOX1 (del inglés, *Lectin-like ox-LDL receptor-1*) y, serán captadas, transportadas y procesadas por el retículo endoplásmico del macrófago formando gotas lipídicas que conducen a su diferenciación a células espumosas. El proceso de formación de células espumosas y la retención y migración de otras células del sistema inmune, linfocitos T y B favorecen el desarrollo de la lesión incipiente o estría grasa [19].

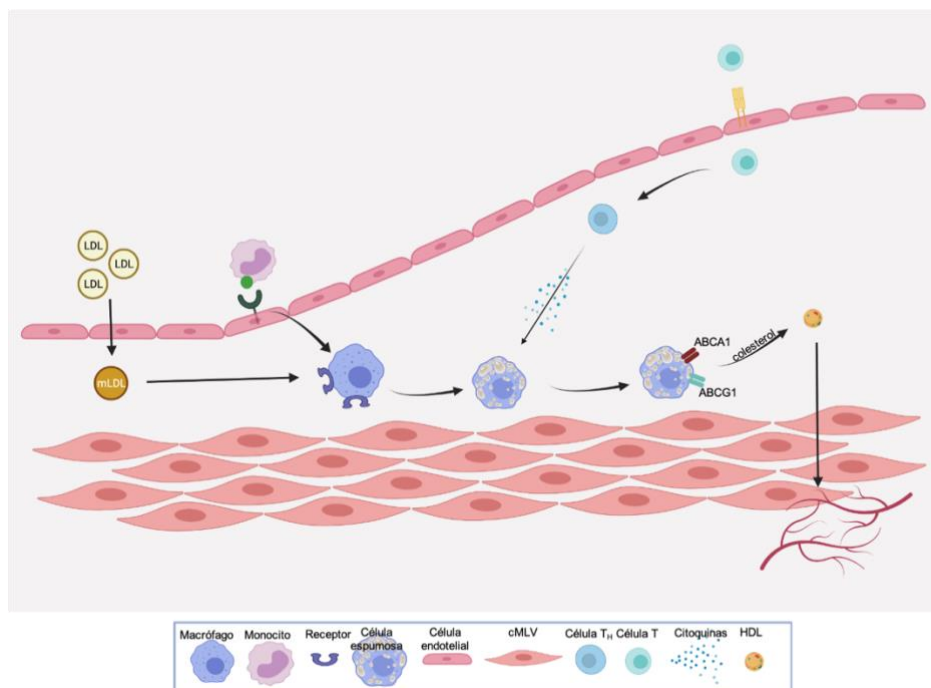


Figura 4. Iniciación y progresión de la aterosclerosis. La aterogénesis se inicia con el reclutamiento de células inflamatorias hacia la túnica íntima. Las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión para los monocitos, los cuales, una vez se encuentran en la túnica íntima expresan receptores “basura” que intervienen en el reconocimiento de las partículas de LDL modificadas (LDLm) y conduce a la formación de células espumosas. Los linfocitos T, menos abundantes que los monocitos, también penetran en la íntima y, tras su activación, los linfocitos Th secretan citoquinas que magnifican y mantienen la respuesta inflamatoria en la íntima. Los transportadores ABCA1 y ABCG1 participan en el transporte reverso de colesterol eliminando el exceso de colesterol hacia la sangre y disminuyendo la formación de células espumosas (Adaptado de Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011) [20]) (Created with <http://BioRender.com>).

Un mecanismo compensatorio en el metabolismo del colesterol es la vía mediada por la formación de lipoproteína HDL (del inglés, *High Density Lipoprotein*) que elimina el exceso de colesterol de las células e inhibe el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Los transportadores de membrana ABCA1 y ABCG1 (del inglés, *Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Transporter A1 y G1*, respectivamente) junto con la proteína ApoA-I en su estado libre de lípidos, son responsables del transporte reverso de colesterol en macrófagos disminuyendo la formación

de células espumosas. La formación de partículas de HDL en la placa aterosclerótica favorece también la presencia de la enzima paraoxonasa 1 que evita la oxidación de LDL [21].

2.4.2. Progresión de la placa de ateroma

La lesión progresa a medida que aumenta el tamaño de la placa aterosclerótica y el mecanismo compensatorio de la HDL resulta insuficiente. A pesar de que los macrófagos son numéricamente predominantes, otras células inflamatorias como los linfocitos T también se localizan en el interior de la lesión. Las células T inducen en macrófagos la secreción de citoquinas, como interferón γ (IFN γ) o los factores de necrosis tumoral TNF α y TNF β que estimulan la proliferación de macrófagos, amplifican la respuesta inflamatoria y producen la activación, proliferación y trans migración de las cMLVs desde la capa media al subendotelio o neoíntima contribuyendo al crecimiento de la placa. Las cMLVs reclutadas pueden captar LDLm y secretan componentes de la matriz extracelular (tales como colágeno, elastina, proteoglicanos y glucosaminglicanos) que, junto con las células espumosas derivadas de macrófagos, contribuyen al engrosamiento de la túnica íntima. Esta migración de las cMLVs hasta la luz del vaso conduce a la formación de una capa fibrosa o fibroateroma. Esta capa o cubierta fibrosa recubre las células espumosas de la placa y el núcleo de células inflamatorias. Las células espumosas, junto con las propias células endoteliales, favorecen el desarrollo de la placa aterosclerótica secretando citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas (MMP) y catepsinas que debilitan la placa [19]. Durante la mayor parte del transcurso de la enfermedad aterosclerótica, la lesión se expande alejándose del centro del vaso preservando el calibre de la luz arterial. Este remodelado de la pared arterial durante la aterosclerosis se produce gracias a la producción de proteinasas por parte de las cMLVs, como las MMP3, que degradan la matriz extracelular [22].

La evolución de la placa puede conducir a procesos de muerte celular como apoptosis, necrosis o senescencia de las células espumosas liberando, entre otros, los lípidos que acumulan en su interior. La fagocitosis ineficiente de los cuerpos necróticos o apoptóticos por parte de otros macrófagos, proceso conocido como eferocitosis, conduce a la acumulación de desechos celulares y lípidos extracelulares formando núcleos necróticos dentro de la placa [20].

2.4.3. Vulnerabilidad de placa

Las lesiones ateroscleróticas en estadios avanzados pueden causar manifestaciones clínicas al producirse la estenosis que limita el flujo sanguíneo originando la consiguiente isquemia del tejido, o bien precipitar el fenómeno tromboembólico al romperse o erosionarse.

Los procesos de muerte celular mencionados anteriormente dan lugar a la generación de placas inestables o vulnerables. Éstas se caracterizan por un gran núcleo lipídico, con núcleos necróticos, y células inflamatorias cubierto por una fina capa fibrosa (<60 μ m) debida a una

disminución del contenido en cMLVs y a los componentes extracelulares que producen. Por el contrario, las placas en las cuales el contenido lipídico es limitado y presentan una gruesa capa fibrosa con un alto contenido en cMLVs son conocidas como placas estables.

El principal mecanismo por el que se producen placas inestables se debe a la infiltración de macrófagos y linfocitos inflamatorios que inducen la apoptosis de las cMLVs, células endoteliales y de los propios macrófagos [23].

El debilitamiento de la placa fibrosa es un paso importante previo a la rotura de la placa y consiguiente desarrollo de los efectos trombóticos de esta patología. Entre los mecanismos que producen los cambios estructurales cabe destacar la degradación de los componentes de la matriz extracelular realizada por enzimas proteolíticas liberadas por macrófagos y neutrófilos de la placa como las metaloproteinasas MMP8, MMP9, MMP12 y MMP13. La degradación de matriz extracelular conduce a una pérdida de las interacciones célula-célula y promueven la apoptosis de las cMLVs, principal fuente de colágeno y otros componentes de la matriz [24].

Otros mecanismos que debilitan la placa de ateroma son el estrés oxidativo y la neoangiogénesis. El incremento de LDLm en la placa produce un incremento del estrés del retículo endoplasmático en macrófagos que induce la apoptosis de estos y la expansión del núcleo necrótico. La excesiva apoptosis de macrófagos conduce a una menor expresión de la citoquina TGF β (del inglés, *Tumor Growth Factor β*) por parte de las células T que destaca por su papel antiinflamatorio promoviendo también la deposición de colágeno por parte de las cMLVs.

Cuando el grosor de la capa fibrosa cae por debajo de los 0.5mm la hipoxia produce el engrosamiento de la capa vascular de la adventicia conocida como *vasa vasorum*. Los vasos que constituyen la *vasa vasorum* de placas con un núcleo rico en lípidos ven incrementada su permeabilidad debido a la continua exposición de agentes inflamatorios. Esta neovascularización es fuente de colesterol y lípidos y que incrementan la inflamación [19].

En muchos casos, durante su evolución las placas ateroscleróticas desarrollan regiones calcificadas que se producen como consecuencia de una eferocitosis ineficiente que conduce a una deposición de calcio. No se ha observado una correlación entre el incremento de la calcificación y un descenso en la inestabilidad de placa; sin embargo, las calcificaciones de menor tamaño y localizadas de forma dispersa producen un estrés mecánico que desestabiliza la placa pudiendo provocar su rotura [25,26].

3. Efectos de DMT2 en la enfermedad cardiovascular

La ECV es la mayor causa de morbimortalidad asociado con la DMT2. Así, se observa una mayor incidencia de placas ateroscleróticas rotas y trombóticas con una frecuencia de 2-5 veces mayor respecto a la población no diabética de edad y sexo similares.

La alta prevalencia de ECV en los pacientes con DMT2 se relaciona con el grado de hiperglucemia, dado que un incremento del 1% de glucohemoglobina (HbA1c) se asocia con un incremento del 18% del riesgo de padecer ECV.

El aumento de incidencia está relacionado con un perfil lipídico característico de los pacientes con DMT2 inducido por la RI. Este perfil lipídico es un tipo de dislipidemia mixta conocida como dislipidemia aterogénica (DA). La DA se define como un desequilibrio entre la concentración de lipoproteínas proaterogénicas que contienen apolipoproteína B enriquecidas en triacilglicéridos (TG) y la disminución de la concentración de lipoproteínas antiaterogénicas que contienen la proteína ApoA-I (HDL) [27,28].

La DA también se puede definir por la alteración de 3 parámetros plasmáticos conocido como la tríada lipídica (Figura 5).

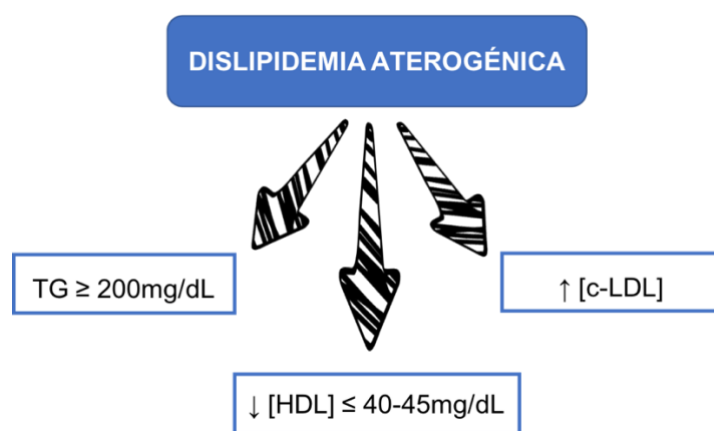


Figura 5. Tríada lipídica. La tríada lipídica se caracteriza por una hipertrigliceridemia (TG ≥ 200 mg/dL [≥ 2,3 mmol/L]); una disminución en la concentración de partículas HDL de ≤ 40 mg/dL [≤ 1,0 mmol/L] en hombres y ≤ 45 mg/dL [≤ 1,2 mmol/L] en mujeres; y un incremento de la concentración de partículas de colesterol unido a LDL (c-LDL) [29].

El factor etiológico subyacente que contribuye a desarrollar un mayor riesgo de padecer ECV es la RI. En los estados de insulinoresistencia, entre los que se incluyen obesidad, intolerancia a la glucosa o estadios tempranos de DMT2, las células β pancreáticas incrementan la secreción de insulina para compensar la pérdida de sensibilidad a la misma produciendo una hiperinsulinemia. La insulina, a elevadas concentraciones, estimula la vía de las MAPK (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) que cataliza la fosforilación de factores de

transcripción que estimulan el crecimiento, proliferación y diferenciación de las cMLVs, activan vías inflamatorias y generan resistencia a la insulina. La síntesis de óxido nítrico (NO), potente vasodilatador y agente antiaterogénico, mediada por insulina se ve también inhibida en los estados de RI, generándose vasoconstricción y disfunción endotelial (Figura 6) [7,30,31].

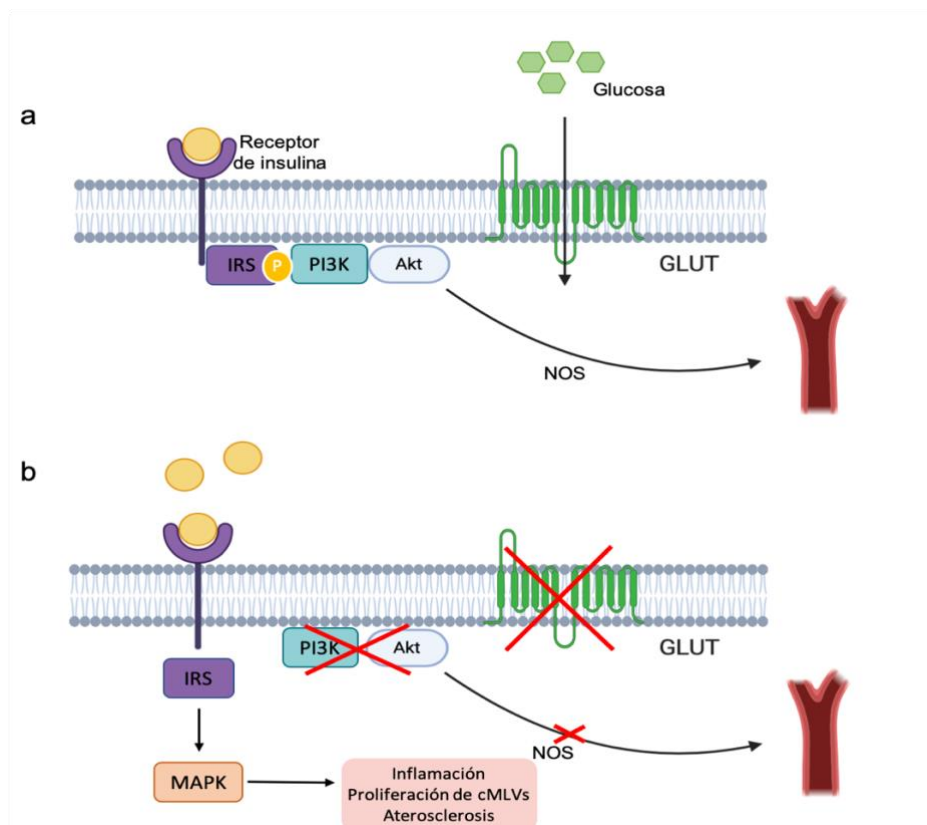


Figura 6. Esquema de la señalización de insulina. (a) La insulina se une a su receptor de membrana (IRS) lo cual produce su fosforilación y la activación de la vía PI3K/Akt que conduce a un aumento del transporte de glucosa y estimula la producción de NO por parte de las células endoteliales. (b) En DMT2 la resistencia a la insulina inhibe la producción de NO (disfunción endotelial) y se activa el eje MAPK que estimula las vías inflamatorias, así como también la diferenciación y proliferación de cMLVs y la aterogénesis. PI3K: fosfatidil inositol 3-quinasa; NOS: óxido nítrico sintasa. (Adaptado de DiPino & DeFronzo, 2019) (Created with <http://BioRender.com>)

Por todo esto la RI se ha asociado con un conjunto de disfunciones metabólicas entre las que se incluye la DA, que conjuntamente se han denominado síndrome de resistencia a la insulina (SRI), siendo cada uno de los componentes de SRI un factor de riesgo independiente para desencadenar una ECV.

Asimismo, estudios en modelos animales han demostrado que la RI *in situ* en el lecho vascular favorece la progresión e inestabilidad de la placa de ateroma mediante diferentes mecanismos. Por un lado, actúa sobre los macrófagos aumentando la apoptosis y disminuyendo la eferocitosis [32–34]. Y, por otro lado, acelera la formación de placas inestables reduciendo la supervivencia de las cMLVs, lo cual favorece la formación de capas fibrosas finas, y produce un

aumento de la secreción de los mediadores inflamatorios desde estas células provocando la formación de núcleos inflamatorios [35,36].

4. Alteración del metabolismo lipídico: enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), también conocida como esteatosis hepática o hígado graso, es una de las patologías hepáticas crónicas más común del mundo occidental. Esta enfermedad se halla muy relacionada con el síndrome metabólico, y el aumento alarmante de obesidad y de DMT2 ha ocasionado que su prevalencia se vea incrementada. La presencia de obesidad, RI y/o DMT2 es un factor de riesgo importante para el desarrollo de EHGNA. Hasta un 90% de las personas obesas y hasta un 70% de la población con sobrepeso desarrollará EHGNA [37,38].

Histológicamente, la EHGNA comprende un amplio espectro de enfermedades que abarcan desde esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) que se caracteriza, además de esteatosis, por degeneración balonzante de los hepatocitos, inflamación lobular, fibrosis y activación de las células estrelladas [39].

LA EHGNA es asintomática *per se* y se caracteriza por una acumulación de más del 5% de esteatosis en el hígado no relacionada con el abuso de alcohol y/o drogas, uso de medicación esteatogénica o de carácter hereditario [40,41]. La coexistencia de EHGNA y la RI promueve la inflamación de bajo grado que acelera la transición hacia la esteatohepatitis (EHNA) que está caracterizada por un metabolismo deficiente y fibrosis y que puede evolucionar hasta hepatocarcinoma celular (HCC) [42,43]. No existe un tratamiento efectivo para las complicaciones metabólicas asociadas a la EHNA por lo que es un problema de salud global y un desafío socioeconómico [44].

4.1. Características de la EHGNA

El desarrollo y progresión de EHGNA a EHNA siguen sin estar completamente claros, pero sí existen evidencias que sugieren que la patogénesis de la enfermedad se relaciona con múltiples procesos como son la hepatotoxicidad y apoptosis mediada por ácidos grasos, inflamación y daño hepático, RI y disfunción del tejido adiposo que acaban conduciendo al desarrollo de esteatosis hepática, inflamación y fibrosis (Figura 7) [45].

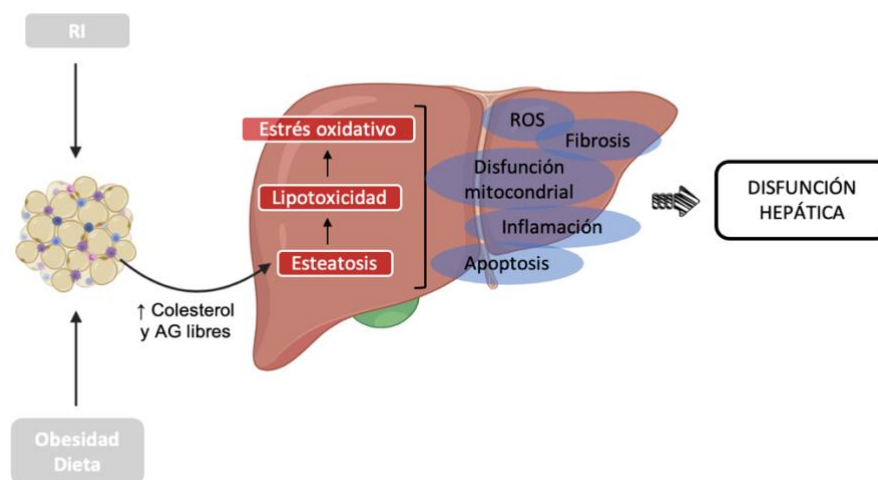


Figura 7. Complicaciones hepáticas en la EHGNA. La EHGNA es una patología que está determinada por factores externos tales como dieta, obesidad o la resistencia a la insulina (RI). El incremento de tejido adiposo contribuye a un incremento en la movilización de ácidos grasos libres que acaba originando un incremento de los niveles intrahepáticos de triglicéridos (TG). Este influjo excesivo de TG conduce a lipotoxicidad, inflamación, formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y disfunción hepatocelular. (Adaptado de González et al., 2019) (Created with <http://BioRender.com>)

Los lípidos más abundantes en la esteatosis hepática son los TG y ésteres de colesterol, que se acumulan en el interior de hepatocitos y células de Kupffer formando gotas lipídicas para equilibrar el exceso de ácidos grasos libres. La acumulación de los TG hepáticos se produce principalmente a partir de los NEFA liberados por el tejido adiposo (más del 66%), por los TG provenientes de la dieta y por la lipogénesis *de novo* (26%). Durante la fase de ayuno y mediante la lipogénesis *de novo* (LDN), el hígado almacena carbohidratos en forma de lípidos usando el acetil-CoA derivado de la glucólisis para sintetizar AG de cadena larga y que se exportan en partículas de VLDL. Este proceso está regulado por factores transcripcionales tales como SREBP1 (del inglés *sterol regulatory element binding protein*) o ChREBP (del inglés *carbohydrate regulatory element binding protein*) [46–48].

Sin embargo, en el paciente de EHGNA se observa que esta LDN se ve incrementada hasta en tres veces respecto al control cuando el tejido adiposo es incapaz de almacenar más TG. A pesar de los que los TG se van excretando mediante una mayor exportación de partículas VLDL, esto no es suficiente para compensar el influjo excesivo de AG hacia el hígado y como consecuencia se produce hipertrigliceridemia. Como mecanismo de protección frente a este incremento excesivo de AG las mitocondrias de los hepatocitos aumentan su utilización mediante la β -oxidación y fosforilación oxidativa, lo cual acaba conduciendo a la formación de especies

reactivas del oxígeno (ROS) que generan la peroxidación de lípidos y proteínas, daño en el ADN e inflamación [48].

El tejido adiposo tiene funciones endocrinas participando en la liberación de hormonas y citoquinas conocidas como adipoquinas que median respuestas inflamatorias e inmunes. Múltiples estudios han demostrado la correlación inversa entre niveles de adipoquinas y de esteatosis hepática. La hipertrofia de adipocitos que se produce en casos de obesidad produce un desequilibrio en los niveles de adipoquinas que inhiben la β -oxidación y estimulan la activación de la LDN. Asimismo, el tejido adiposo es responsable de la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL6 cuyos valores son elevados en pacientes de EHNA respecto a la esteatosis simple [48]. Estas citoquinas conducen a un estado inflamatorio hepático que favorece la progresión de EHGNA [49].

Se ha observado que en estadios iniciales de EHNA las células de Kupffer y las células T reguladoras (Treg) polarizan hacia un fenotipo proinflamatorio y secretan, entre otras, citoquinas como IL17 e IFN γ [50,51]. Además, estudios recientes han señalado la implicación de otras poblaciones inmunes en la progresión de la EHNA. Así, las células T colaboradoras (Th) 22 y las células Treg se han indicado como protectoras frente a la progresión de la EHGNA, mientras que las Th17 y las células T CD8+ citotóxicas inducen daño hepático y fibrosis [52]. Otros estudios han demostrado que las células T $\gamma\delta$ CD3+ son clave en la progresión de la EHNA mediante el reclutamiento de células B, neutrófilos y monocitos en hígado [53].

Todos estos procesos conducen a un incremento del estrés oxidativo de los hepatocitos y a la disfunción mitocondrial, lo cual activa la señalización de la vía NF- κ B (del inglés *Nuclear factor-kappaB*) favoreciendo la apoptosis de los hepatocitos y a la fibrosis [40,54].

La RI en la EHGNA, se ve agravada por la liberación de AG desde el tejido adiposo y estimula la expresión transcripcional de los factores SREBP-1c y ChREBP que aumentan la expresión de enzimas lipogénicas como ACC1 (del inglés *acetyl-CoA carboxylase 1*) y FAS (del inglés *fatty acid synthase*). Ambos factores se han asociado a un incremento de LDN y una sobreproducción de VLDL mencionado anteriormente.

La liberación de NEFA produce además lipotoxicidad al acumularse en diversos tejidos como el hígado, lo cual acaba desencadenando una producción aumentada de ROS y un incremento del estrés del RE que aceleran la progresión de la EHGNA. El exceso de AG en el tejido adiposo activa las vías inflamatorias produciendo RI en el tejido adiposo. Las vías más relevantes son la vía del complejo enzimático IKK (del inglés *I κ B kinase*) mediante la cual se activan los receptores TLR-4 (del inglés *Toll-like receptors 4*) en macrófagos y adipocitos; la vía de señalización del complejo JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*) en la cual se inhibe la señalización de insulina; la activación del factor de transcripción CREB-H (del inglés *cAMP responsive element-binding protein H*) que promueve la producción de proteína C reactiva y generación de ROS; y la vía mediada por las proteínas JAK-STAT (del inglés (del inglés *Janus kinase* y *Signal transducer and*

activator of transcription) que regula la inflamación asociada a síndromes metabólicos tales como obesidad o diabetes [47,55].

5. Los cotransportadores sodio glucosa como diana terapéutica de la DMT2

Como se ha mencionado anteriormente la DMT2 y sus características, son un factor de riesgo importante para las complicaciones metabólicas como son la aterosclerosis y ECV, así como la EHGNA.

Existen numerosos mecanismos por los cuales las características de la DMT2 aceleran la aterosclerosis. Entre éstos se encuentran tanto mecanismos inflamatorios inducidos por la RI como efectos glucotóxicos causados por la hiperglucemia sostenida en el tiempo que, junto con la dislipidemia y la hipertensión, favorecen los eventos cardiovasculares.

Estos descubrimientos han llevado a la hipótesis de que los fármacos antidiabéticos pueden ejercer ateroprotección incluso antes del inicio de la DMT2. En los últimos años se han llevado a cabo tanto estudios en modelos experimentales como en ensayos clínicos con la finalidad de evaluar el uso extendido de los antidiabéticos. Uno de los fármacos antidiabéticos más recientes son los inhibidores de los cotransportadores sodio-glucosa.

5.1. Estructura de los cotransportadores sodio-glucosa y mecanismo de acción

Los cotransportadores sodio-glucosa (SGLT) son transportadores activos secundarios que hacen uso de la energía almacenada en forma de gradiente electroquímico para introducir solutos específicos como azúcares, aminoácidos y otras moléculas a través de membrana en el interior de las células. El dominio principal de 10 hélices transmembrana (TM) es la señal de identidad de esta familia de transportadores conocida como la superfamilia LeuT, la cual se caracteriza por poseer un motivo repetido de 5 hélices invertidas [56,57].

La familia de genes, en humanos, es la *SLC5* que contiene hasta 12 miembros siendo el SGLT1 y SGLT2 los más importantes. La expresión del ARNm de SGLT2 (también conocido como *SLC5A2*) ha sido observada mayoritariamente en riñón en los segmentos S1 y S2 de los túbulos proximales, mientras que la expresión del ARNm de SGLT1 (también *SCL5A1*) se observa principalmente en intestino delgado y en menor proporción en riñón en la membrana del segmento S3 [58].

En individuos no diabéticos adultos el filtrado de glucosa en la nefrona es de 160-180 gramos/día que son reabsorbidos casi en su totalidad en las células epiteliales de los túbulos proximales. De la glucosa filtrada más del 90% es reabsorbida en los segmentos iniciales por

Introducción

SGLT2, y el resto es reabsorbido en el segmento S3 mediante SGLT1, por lo que en condiciones fisiológicas estos transportadores son responsables de toda la reabsorción renal de glucosa [59].

El mecanismo por el cual se produce el transporte de azúcares acoplado a sodio ha sido principalmente explicado en el SGLT1 humano, aunque el modelo del SGLT2 es similar esquematizado en la Figura 8. En ellos, así como en otros miembros de la superfamilia LeuT, los lugares de unión del sustrato se localizan en el centro de la proteína, presentando compuertas de entrada y de salida que aíslan al sustrato tanto del medio extracelular como del intracelular. El sitio de unión específico para el sodio se denomina Na²-site y adopta diferentes disposiciones comparando la conformación hacia dentro (*inward*) o hacia fuera (*outward*). El sodio se une inicialmente en la cara extracelular (estado 1) lo cual origina la apertura de la compuerta externa (estado 2) permitiendo al azúcar quedar atrapado en su lugar de unión (estado 3). La unión de ambos sustratos induce un cambio del transportador hacia la conformación *inward*, que abre la compuerta interna (estado 4) y promueve el desplazamiento de la hélice transmembrana 8 (TM8) que forma parte de Na²-site. Este desplazamiento genera un Na²-site menos favorable promoviendo la liberación del sodio al citoplasma celular, que conducirá a la liberación del azúcar y el cierre de la compuerta interna (estado 5). Finalmente, el ciclo culmina con el cambio a la conformación *outward* libre de ligando volviendo al estado inicial (estado 1) [56,58].

La acumulación intracelular de sodio y glucosa se ve aliviada por la acción de los transportadores GLUT2 y la bomba Na⁺/K⁺ de la membrana basolateral de las células epiteliales, que transportan ambas moléculas al fluido intersticial desde donde son recogidas por los capilares peritubulares [57].

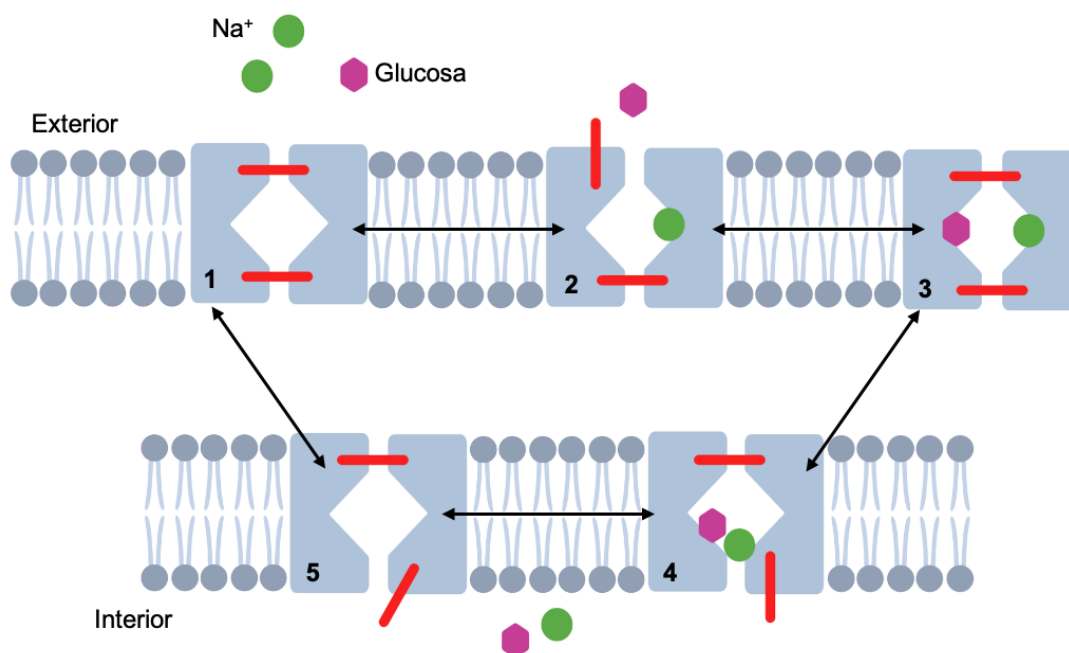


Figura 8. Esquema del funcionamiento de SGLT (adaptación de Ghezzi, 2018) (Created with <http://BioRender.com>).

5.2. Desarrollo de los inhibidores SGLT

En el siglo XIX se describieron las primeras mutaciones genéticas hereditarias asociadas al SGLT2 en humanos, cuyo resultado era la pérdida de glucosa por la vía urinaria y conocida como glucosuria renal familiar. Este síndrome autosómico recesivo es benigno, pero puede verse asociado a poliuria, polidipsia, enuresis nocturna, polifagia e infecciones del tracto urinario recurrentes. El estudio de estas mutaciones poco frecuentes, que aún no están completamente comprendidas, permitió observar en los individuos que la padecían que no había complicaciones serias, lo cual llevó a considerar a los inhibidores del cotransporte sodio-glucosa (SGLTi) como una herramienta potencialmente segura para disminuir los niveles plasmáticos de glucosa en pacientes diabéticos [60].

Curiosamente, estudios en roedores y en pacientes con DMT1 y DMT2 han permitido observar un incremento de la expresión renal de SGLT2 combinado con un crecimiento de los túbulos proximales, lo que genera una mayor reabsorción de glucosa y sodio a través de este tipo de transportadores. Esta sobreexpresión de SGLT2 agrava los niveles de glucosa en sangre y es considerada una mala adaptación producida en la diabetes. Ésta evita una excreción eficiente de la glucosa en condiciones de hiperglucemia que combinado con la mayor reabsorción de sodio resulta en un incremento del volumen extracelular promoviendo además una elevación de la presión sanguínea [59].

El primer inhibidor del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2i) descubierto fue la florizina, compuesto natural encontrado en la corteza de las raíces, hojas y frutos del manzano. Este glucósido es un inhibidor dual competitivo de SGLT2 y SGLT1 que bloquea el transporte de glucosa a nivel renal. Sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua, su poca biodisponibilidad oral y la inhibición no selectiva de SGLT1 y SGLT2 que generaba diarrea y mala absorción de la glucosa, la florizina se descartó como candidato [58,60].

Estudios en los años 80 llevaron a la identificación de SGLT2i selectivos derivados de la florizina con un grupo C-glucósido, siendo conocidos este grupo de medicamentos como gliflozinas. Este nuevo grupo de moléculas es una variante química de la florizina consistente en la inclusión de un átomo de carbono unido al glucósido que les confiere una mayor resistencia a la hidrólisis por β -glucosidasas que aumenta la biodisponibilidad de estos derivados químicos [60].

Las gliflozinas producen la inhibición selectiva de SGLT2 que promueve la excreción renal de glucosa y reduce la hiperglucemia sin presentar los efectos gastrointestinales adversos que se producen por la inhibición de SGLT1. Es por todo ello que las gliflozinas se han propuesto como agentes antihiper-glucémicos para el tratamiento de la DMT2 mediante la inhibición de la reabsorción renal de glucosa [61].

5.3. Dapagliflozina

La dapagliflozina es un medicamento de larga duración de la familia de las gliflozinas que bloquea la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal del riñón y promueve la glucosuria. Es administrada vía oral con absorción vía intestinal y, al presentar una selectividad 1200 veces mayor por SGLT2 respecto a SGLT1, evita la inhibición intestinal de SGLT1 y posibles efectos gastrointestinales adversos [59,62].

Estudios *in vitro* han mostrado que la dapagliflozina presenta un poder inhibitorio similar para el SGLT2 de rata y el SGLT2 de humano y, al administrarlo en un modelo de roedor de DMT1, los niveles de glucosa en sangre se veían reducidos en más de un 50% [63].

Otros estudios llevados a cabo en modelos de roedor de DMT2 y en los que han testado diferentes tipos de gliflozinas, entre ellas la dapagliflozina, se observó una menor hiperglucemia, una disminución significativa en los niveles de mediadores inflamatorios plasmáticos y una mejora en la disfunción endotelial en aquellos animales a los que habían administrado el tratamiento [64,65]. Sin embargo, Gaspari *et al.* (2017) observaron en un modelo murino de aterosclerosis que los animales a los que se les administraba el tratamiento presentaban una mejora en la función endotelial sin observarse variaciones en los niveles de glucosa plasmáticos en el grupo al que se le había administrado el tratamiento [66].

Ensayos clínicos recientes llevados a cabo en pacientes con DMT2 y con elevado riesgo de presentar eventos CV han registrado una menor tasa de muerte u hospitalización por fallo cardíaco en aquellos pacientes que habían recibido tratamiento, sin diferencias en la causa CV de muerte en sujetos que recibieron tratamiento con SGLT2i. Así también, en los resultados obtenidos por Nassif *et al.* (2019) en pacientes con fallo cardíaco crónico y con o sin DMT2, no se observó una reducción significativa del fallo cardíaco valorado en base a los niveles del péptido natriurético tipo B, pero si hubo un incremento en la proporción de pacientes que mostraron mejoras clínicas respecto a la insuficiencia cardíaca [62,67].

Múltiples estudios de SGLT2i llevados a cabo en pacientes de DMT2 con ECV han presentado efectos CV favorables, así como un retraso en la progresión de la enfermedad renal. Es por ello necesario evaluar este fármaco y su impacto en la aterosclerosis independientemente de su efecto hipoglucémico y natriurético.

6. Modelos murinos de aterosclerosis, diabetes y EHGNA

6.1. Deficiencia en apolipoproteína E: modelo de hipercolesterolemia y aterosclerosis

La apolipoproteína E (apoE) es una proteína plasmática de 299 aminoácidos y 34kDa de peso molecular con dos dominios estructurales. ApoE existe principalmente como componente de complejos lipoproteicos y se expresa en múltiples órganos, principalmente en hígado y cerebro tanto en ratones como en humanos. Participa en el metabolismo del colesterol dirigiendo el transporte y distribución de lípidos y actuando como ligando del receptor de las partículas LDL [68].

El ratón deficiente en el gen *ApoE* (*ApoE*^{-/-}) es un modelo experimental de hipercolesterolemia y aterosclerosis generado simultáneamente en 1992 por dos laboratorios independientes usando tecnología genética de recombinación [69]. Los ratones *ApoE*^{-/-} son sanos, viables, fértiles y de peso similar a los ratones silvestres (*WT*, del inglés *Wild Type*). Sin embargo, la ausencia del gen *ApoE* anula la captación y metabolización de las lipoproteínas que la contienen por sus receptores, produciéndose hipercolesterolemia con niveles elevados de partículas VLDL y niveles disminuidos de lipoproteínas HDL comparado con los ratones *WT*. Sin embargo, los niveles de TG no están afectados en ratones *ApoE*^{-/-}.

La hipercolesterolemia desarrollada en los ratones *ApoE*^{-/-} genera la aparición de placas fibrosas a las 20 semanas de edad, que se acelera con dietas ricas en grasas y colesterol, y con lesiones ateroscleróticas en regiones vasculares afectadas típicamente en humanos. Las placas ateromatosas desarrolladas por los ratones *ApoE*^{-/-} presentan características similares a las que se forman en humanos, siendo éste un buen modelo animal para estudiar los mecanismos moleculares de la aterosclerosis e investigar los factores genéticos y ambientales que modifican el proceso aterogénico [69,70].

6.2. Doble deficiencia en *ApoE* e *Irs2*: modelo de aterosclerosis acelerada por DMT2

El receptor de insulina IRS2 participa en la regulación de la función de las células β pancreáticas, tal y como se ha demostrado en diferentes estudios en ratones modificados genéticamente que presentaban deficiencia en la expresión de este receptor y en los cuales se observaba un deterioro progresivo en la homeostasis de la glucosa y de la insulina [71].

Estudios realizados en nuestro laboratorio y en otros indican que un fallo en la señalización de insulina, en modelos murinos de aterosclerosis, producen un agravamiento de la lesión aterosclerótica [34,72]. Los animales que presentan la inactivación de *Irs2* combinada con la ausencia del gen *ApoE* (ratón *ApoE*^{-/-Irs2}^{-/-}) presentan intolerancia a la glucosa, RI, hipercolesterolemia y un incremento en la velocidad de desarrollo de la aterosclerosis. Estudios posteriores demostraron que los animales que presentaban una inactivación parcial de *Irs2*, ratones *ApoE*^{-/-Irs2}^{+/-}, era suficiente para presentar un mayor desarrollo de la aterosclerosis, así como también una mayor vulnerabilidad de placa [72].

De entre los mecanismos descritos en la generación de mayor placa vulnerable en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* inducido por RI se encuentra una mayor apoptosis de cMLVs que conduce a la generación de capas fibrosas más delgadas [35].

Estos estudios demuestran que el ratón *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* es un modelo idóneo para el estudio de la fisiopatología de la DMT2 y de la aterosclerosis, así como para la evaluación de la efectividad y los mecanismos de acción de fármacos antidiabéticos en la progresión de la placa. En este sentido, los ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con los antidiabéticos lixisenatida y liraglutida mostraron una reducción del tamaño y vulnerabilidad de la placa mediante disminuyendo la reducción de macrófagos proinflamatorios en la placa de ateroma [73].

6.3. Modelos de ratón de EHGNA inducida por dieta grasa

La reproducción exacta de la patogénesis de las enfermedades humanas en modelos animales es un proceso complejo, por ello es importante escoger un modelo adecuado para identificar los procesos moleculares asociados a la enfermedad. La EHGNA se ha estudiado en animales sometidos a diferentes dietas durante distintos intervalos de tiempo; sin embargo, sigue sin existir consenso sobre qué dieta mimetiza mejor la sintomatología clínica y patológica de la enfermedad.

La dieta más empleada es aquella que induce la EHGNA mediante una dieta deficiente en metionina-colina (DDMC). Esta dieta con alto contenido en sacarosa (40%) y moderadamente enriquecida en grasa (10%) induce un fenotipo severo de EHGNA a las 5-7 semanas de administración en ratones. La metionina y la colina son necesarios para la β -oxidación y la producción de VLDL; asimismo, un déficit en colina afecta a la secreción de VLDL lo cual conduce a la acumulación de ácidos grasos en el hígado junto con un descenso en la síntesis hepática de VLDL. A pesar de que esta dieta consigue algunas de las características histológicas propias de la EHGNA como estrés oxidativo, inflamación, estrés oxidativo y fibrosis hepática, la hepatotoxicidad irreversible que genera combinado con un perfil metabólico opuesto al que se observa en humanos le alejan de ser el modelo animal óptimo para examinar los parámetros metabólicos característicos de la EHGNA [45,74].

Los modelos murinos que incorporan a su dieta grasas e hidratos de carbono mimetizan la etiología de la EHGNA en humanos. Otra de las dietas empleadas es la dieta Western en la cual se incorporan grasas predominantemente saturadas, junto con colesterol y glucosa o fructosa para simular el estilo de comida rápida. Esta dieta induce obesidad, junto con RI y síndrome metabólico, sin embargo, los tiempos de administración son mayores, pudiendo además favorecer el desarrollo de tumores hepáticos. Esta dieta mimetiza el estado de la gran mayoría de pacientes EHGNA/EHNA lo cual le hace ser la candidata perfecta para estudiar el impacto metabólico y el riesgo cardiovascular relacionados con la DMT2 y la aterosclerosis, así como también para comprender los factores implicados en la progresión de la enfermedad [45,74,75].

No obstante, la incorporación de colesterol como las dietas Western han sido catalogadas más como dietas aterogénicas. Sin embargo, son dietas más fisiológicas y han dado lugar a descubrimientos importantes sobre los mecanismos del desarrollo de la enfermedad de EHGNA y EHNA asociadas a las alteraciones metabólicas [75].

En nuestro laboratorio hemos utilizado una dieta con un 0.75% de colesterol y un 10.8% grasa la cual dio lugar a un modelo combinado de EHGNA y RI que cursa con inflamación y activación de la MAPK de estrés p38 [76,77]. Sin embargo, dicha dieta produjo niveles de esteatosis baja con un NAS score de alrededor de 2 [77].

Por lo que se requieren estudios adicionales con dietas con composiciones de grasas, azúcares y colesterol diferentes que permitan obtener modelos animales con una patogenia similar al humano.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Con los antecedentes descritos con anterioridad se formularon las siguientes hipótesis:

HIPÓTESIS 1. Dado que el tratamiento con SGLT2i en pacientes con DMT2 produce una disminución de los niveles de glucosa en plasma la dapagliflozina podría mejorar el metabolismo de la glucosa, específicamente la RI y reducir la aterosclerosis en un modelo murino de RI y aterosclerosis acelerada.

HIPÓTESIS 2. Considerando las diferentes dietas empleadas con la finalidad de obtener un modelo animal que mimetice la patogenia de la EHGA en humanos, una dieta con alto contenido en azúcar, grasa y con elevado nivel de colesterol durante 16 semanas inducirá la sintomatología propia de la enfermedad.

En base a estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivo 1: Estudio de los efectos de la dapagliflozina en un modelo murino con resistencia a insulina (RI) y aterosclerosis acelerada.

- 1.1. Estudio del efecto de la dapagliflozina en el metabolismo en ratones con resistencia a insulina e hipercolesterolémicos, *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*, sometidos a una dieta aterogénica y tratados con dapagliflozina.
- 1.2. Estudio del efecto de la dapagliflozina en la inflamación sistémica en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*.
- 1.3. Estudio del efecto de la dapagliflozina en el desarrollo de aterosclerosis y en las características de la placa de ateroma de ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*, sometidos a una dieta aterogénica.

Objetivo 2: Caracterización de un modelo murino de hígado graso inducido por una dieta rica en azúcar, grasa y colesterol.

- 2.1. Estudio del metabolismo y la esteatosis en ratones sometidos a una dieta rica en azúcar, grasa y colesterol.
- 2.2. Estudio de las alteraciones inmunes y de la inflamación asociada en un modelo murino de esteatosis inducido por una dieta rica en azúcar, grasa y colesterol.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Estudios in vivo en ratones

1.1. Ratones, genotipados y dietas

La estabulación de los animales empleados en la realización de esta tesis tuvo lugar en el animalario de la Unidad Central de Investigación en Medicina (UCIM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. El manejo de ratones y los procedimientos experimentales siguieron la directiva europea 2010/63/EU y el Real Decreto nacional 53/2013 para la protección de animales utilizados para fines científicos. Los procedimientos fueron autorizados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural (Autorizaciones: 2017/VSC/PEA/00081, 2015/VSC/PEA/00050 y 2020/VSC/PEA/00028).

Los ratones *Apo^e-/-Irs2^{+/-}* empleados en los grupos experimentales y control se obtuvieron a partir de cruces de ratones *Apo^e-/-* (C57BL/6J, Charles River, L'Arbresle, Francia) e *Irs2^{+/-}* (C57BL/6J) y fueron genotipados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) para detectar la ausencia del gen *Apo^e* y la ausencia parcial del gen *Irs2*. Los cebadores y las condiciones de PCR necesarias para realizar el genotipado de ambos genes se muestran en las Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente.

Los ratones silvestres, (*WT*, del inglés *wild type*) fueron obtenidos de CHARLES RIVER (Lyon, Francia) y se cruzaron entre sí para la generación de los grupos experimentales y control.

Gen	Cebador	Secuencia 5'→3'
Apo^e	OIMR 180	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCCG
	OIMR 181	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC
	OIMR 182	GCCGCCCGACTGCATCT
Irs2	OIMR upper	CTTGGCTACCATGTTGTTATTGTC
	OIMR lower	AGCTCTGGAGGTTTACTTTCCTAG
	OIMR neo	GCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG

Tabla 1. Cebadores usados en la PCR para el genotipado de *Apo^e* e *Irs2*

Gen	Ciclos	Desnaturalización	Emparejamiento	Elongación
Apo^e	38	94°C, 5 minutos	94°C, 20 segundos	62°C, 30 segundos
Irs2	34	94°C, 1 minutos	94°C, 30 segundos	57°C, 30 segundos

Tabla 2. Condiciones de las reacciones de PCR

Material y métodos

Los animales, que disponían de agua y comida *ad libitum*, se mantuvieron con ciclo controlado de 12 horas luz – oscuridad, una temperatura de 22°C±1 y una humedad relativa del 40-45%.

Su alimentación se basó en una dieta control (6,5% de grasa, ENVIGO Teklad Global Rodent Diets; Barcelona, España).

1.1.1. Diseño experimental en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* para el estudio de la aterosclerosis

Para los estudios de aterosclerosis y el efecto de dapagliflozina, ratones de 8 semanas de edad fueron alimentados con dieta aterogénica (10.8% de grasa, 0.75% colesterol, S4892-E010, Ssniff, Soest, Alemania) durante 8 semanas. Las últimas 6 semanas de dieta los animales fueron asignados aleatoriamente para recibir un tratamiento diario con dapagliflozina (n=11 hembras, n=11 machos; p.o. 3 mg/kg/día) o con vehículo (n=10 hembras, n=11 machos).

La composición del vehículo empleado en el estudio fue de 90% de carboximetilcelulosa (1%) 9.95% de polietilenglicol-400 (PEG-400) y 0.05% del tensoactivo Tween-20 (SIGMA, St. Louis, EEUU).

1.1.2. Diseño experimental en ratones *WT* para el estudio de hígado graso

Los ratones fueron alimentados con una dieta control (DC) (6,5% de grasa, ENVIGO Teklad Global Rodent Diets; Barcelona, España) hasta las 8 semanas de edad, momento en el cual, a la mitad de ellos, se les reemplazó por una dieta con alto contenido en azúcar, grasa y con elevado nivel de colesterol (41.5% de azúcar, 21% de grasa, 1.25% de colesterol, S9052-E0123, SSNIFF, Alemania) durante 16 semanas con el fin de inducir estadios avanzados de esteatosis hepática y a la cual llamamos dieta EHNA (DEHNA). Todos los estudios se realizaron a cabo en ratones macho.

1.2. Medidas metabólicas y ensayos bioquímicos

1.2.1. Determinación del peso corporal y del peso del hígado

El peso corporal de los ratones se determinó mediante el uso de una balanza. El hígado se diseccionó empleando unas tijeras y se pesó, expresándolo como el porcentaje relativo al peso corporal de los ratones.

1.2.2. Determinación de lípidos circulantes en plasma

Para evaluar los niveles de lípidos, el plasma se obtuvo de ratones ayunados durante 15 horas tras centrifugar la sangre durante 30 minutos a 13.500 g y a 4°C usando como anticoagulante EDTA (Ethilenediaminetetraacetic acid Disodium Salt Dihydrate, SIGMA).

La determinación plasmática de lípidos se realizó mediante el uso de kits comerciales (FUJIFILM Wako Diagnostics, CA, EEUU) basados en procedimientos enzimáticos.

Los kits empleados para el análisis de triglicéridos y de colesterol total (c-Total) fueron "*LabAssay Triglyceride*" y "*LabAssay Cholesterol*" (Wako Diagnostics, Mountain View, CA, EEUU), respectivamente. Ambos kits se basan en la oxidación, dando como resultado un producto azulado que se pueden determinar mediante espectrometría a 600nm de longitud de onda. La concentración de lípidos en plasma se determina a partir de una curva patrón y con cantidades conocidas de lípidos.

Para la determinación de c-HDL se mezclaron volúmenes iguales de $MgCl_2$ 1M y 20g/L de sulfato de dextrano (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) y se incubaron en 10 μ l de plasma durante 10 minutos a TA. A continuación, se centrifugó durante 30 minutos a 13.500 g y a 4°C y en el sobrenadante obtenido se realizó la determinación de c-HDL usando el kit "*LabAssay Cholesterol*" (Wako Diagnostics); pudiéndose determinar el colesterol apoB a partir del precipitado obtenido tras la centrifugación.

1.2.3. Determinación del contenido de ácidos grasos libres

Para el análisis de ácidos grasos libres (NEFA, del inglés *Non-esterified fatty acids*) en plasma se utilizó el kit enzimático "*Free Fatty Acid Quantitation Kit*" (SIGMA) y siguiendo en todo momento las instrucciones de la casa comercial. La determinación se realiza a partir de un ensayo enzimático acoplado cuyo resultado es un producto final púrpura que se lee mediante un espectrofotómetro a 570nm de longitud de onda y que es proporcional a la cantidad de ácidos grasos de más de 8 carbonos presentes en la muestra.

Para la cuantificación se utilizó una curva patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de ácido palmítico (1nmol/ μ l).

1.2.4. Estudios de tolerancia a la glucosa y determinación de glucosa e insulina

Para evaluar la tolerancia a la glucosa de los animales, se realizó un test de tolerancia a la glucosa (TTG) en el cual, a los ratones sometidos a un ayuno de 15-17 horas, se les inyecta intraperitonealmente una dosis de glucosa de 2g/Kg de peso corporal partiendo de una solución estéril al 20% de glucosa (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU), analizándose posteriormente los niveles de glucosa e insulina a diferentes tiempos (basal, 15, 30, 60 y 120 minutos). Para medir la glucemia se empleó un glucómetro (Ascensia Elite, BAYER, Sant Joan Despí, España), mientras que los niveles de insulina en sangre se determinaron mediante un kit de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, CRYSTALCHEM, Zaandam, Holanda), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Material y métodos

El método usado para la detección de insulina es un ELISA tipo sándwich en el que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos independientes de la molécula de insulina. A lo largo de la incubación de 2 horas a temperatura ambiente (TA) y en agitación, la insulina de la muestra reacciona con el anticuerpo anti-insulina, que permanece unido a la placa, y con el anticuerpo anti-insulina conjugado al enzima peroxidasa. Tras varios lavados para eliminar el exceso de enzima no unido a insulina el inmunocomplejo se detecta por la reacción con el sustrato TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbencidina). La reacción es detenida tras la adición de H₂SO₄ 0.5M obteniéndose un producto final con color que se pudo determinar mediante espectrometría a 450nm de longitud de onda. Las concentraciones se determinaron a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de insulina en un rango entre 0.1 – 3.2 µg/ml, en la que se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras a cuantificar.

Los resultados de la prueba se calcularon en base al parámetro área debajo de la curva (AUC, *Area Under the Curve*), área resultante de la curva generada al representar tanto la glucosa (AUC_{glucosa}) como la concentración de insulina (AUC_{insulina}) a diferentes tiempos.

1.2.5. Estudios de sensibilidad a la insulina

Para determinar la tolerancia a la insulina de los animales, se empleó la prueba o test de tolerancia a la insulina (TTI) en ratones ayunados durante 4 horas. La glucemia se midió tras la administración intraperitoneal de 0.5 U/Kg de peso corporal de insulina (Humulina, LILLY, Alcobendas, España) a diferentes tiempos (tiempo basal, 15, 30, 45, 60, y 90 minutos).

Los resultados se analizaron mediante el AUC_{glucosa} resultante de la curva generada al representar la concentración de glucosa respecto a los diferentes tiempos.

1.2.6. Determinación del péptido C

El péptido C se forma como proinsulina y se secreta en sangre junto con la insulina, por lo que su determinación se emplea como índice de la secreción de insulina.

La determinación cuantitativa de los niveles de péptido C en plasma se realizó en ratones ayunados durante la noche empleando un kit de ELISA (CRYSTALCHEM) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la adición de la solución sustrato, la concentración de péptido C se obtiene de la interpolación de una curva estándar basada en las absorbancias medidas.

1.3. Análisis histopatológico de tejidos

Tras los tiempos de dieta indicados, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se les practicó una disección longitudinal de la base del abdomen a la parte superior del tórax hasta dejar visibles las vísceras. El lavado de la sangre se realizó seccionando la aorta

abdominal a nivel de la bifurcación ilíaca y perfundiendo 1-2 ml de tampón fosfato salino (PBS1X, *phosphate buffered saline*) directamente en el ápice del corazón usando una aguja 23G.

Para el **análisis de aterosclerosis la aorta** entera (abdominal, torácica y cayado) y el corazón fueron fijados *in situ* mediante perfusión con PFA al 4% (paraformaldehído) (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) a una velocidad aproximada de 1ml/min. A continuación, se extrajeron corazón y aorta desde la inserción diafragmática y, tras eliminar la grasa adherida a la superficie externa de la parte arterial, se fijaron en la misma solución de PFA al 4% a 4°C durante 17-19 horas. Tras la fijación, se procedió a la deshidratación del corazón junto con la zona de inicio de la aorta mediante una escala creciente de alcoholes tal y como se muestra en la Tabla 3 para su posterior inclusión en parafina. La aorta entera sin el corazón y la zona de inicio fue sometida a tinción para la detección de lesión de ateroma.

Para el **análisis histopatológico de hígado**, el tejido, tras el lavado con PBS1X, fue fijado *in situ* mediante inmersión en PFA al 4% durante 4 horas, seguido de un lavado con PBS1X de 10 minutos y se mantuvo en etanol al 70% a 4°C durante toda la noche. La deshidratación consistió en lavados secuenciales en una escala creciente de alcoholes tal y como se indica en la Tabla 1.

Tras la deshidratación de los tejidos, éstos se incubaron en parafina previamente licuada durante 15-17 horas y posteriormente se incluyó en moldes histológicos utilizando una estación de parafina Leica EG1150H y una placa fría EG1150C (LEICA, Wetzlar, Alemania). Para realizar las diferentes tinciones los tejidos se realizaron cortes transversales de 5µm de grosor del corazón e inicio de aorta, previamente incluidos en parafina, con un micrótomos manual Leica RM2125RTS (LEICA). Con la ayuda pincel y pinzas los cortes fueron depositados en baño a 40 °C rociado con alcohol, para la extensión de los cortes y recogida en portaobjetos adhesivos Superfrost Plus (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, EEUU).

Material y métodos

Corazón		Hígado	
Deshidratación	Tiempo	Deshidratación	Tiempo
Etanol 50%	30 minutos	Etanol 80%	15 minutos
Etanol 70%	30 minutos	Etanol 96%	15 minutos
Etanol 80%	30 minutos	Etanol absoluto	2 lavados de 7 minutos
Etanol 95%	2 lavados de 30 minutos	Etanol absoluto/xileno (v/v)	2 lavados de 7 minutos
Etanol absoluto	2 lavados de 30 minutos	Xileno	2 lavados de 7 minutos
Xileno	2 lavados de 15 minutos	-	-

Tabla 3. Protocolo de deshidratación de los tejidos

1.4. Cuantificación de la aterosclerosis

1.4.1. Cuantificación del tamaño de la placa aterosclerótica *en face* en cayado y aorta torácica

La determinación del tamaño de la placa aterosclerótica en cayado aórtico y aorta descendente se realizó mediante una tinción con el colorante Oil red-O (O0625-25G, SIGMA) y su posterior montaje *en face* [35,78].

Las aortas fijadas y seccionadas del corazón fueron sometidas a dos lavados de 5 minutos en metanol al 78% con agitación suave en un agitador basculante. A continuación, se incubaron durante 2-3 horas en una disolución de Oil red-O al 0.02% (p/v), metanol 78% (v/v) y NaOH 0.3 M seguido de dos nuevos lavados de 5 minutos en metanol al 78% para eliminar el exceso de colorante.

Con la finalidad de exponer el lecho vascular para su análisis, las aortas junto con las bifurcaciones que presentan en el cayado se abrieron longitudinalmente bajo una lupa estereoscópica Motic SMZ-143 (MOTIC MICROSCOPES, Xiamen, China) y se montaron en un soporte con la ayuda de agujas.

Se tomaron fotografías de cada una de las arterias usando la cámara de un teléfono móvil y, una vez tomadas las imágenes, la cuantificación de la lesión se realizó determinando el porcentaje de la superficie del vaso cubierta con placa aterosclerótica teñida con el colorante relativizada al área total de la aorta. Para el análisis morfométrico de la arteria, se empleó el programa de análisis de imagen Fiji (IFiji, <https://imagej.net/Fiji>).

1.4.2. Cuantificación de la aterosclerosis en el seno aórtico e inicio de aorta

La determinación de la placa de ateroma en el seno aórtico e inicio de aorta se llevó a cabo en cortes transversales teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una cadena de lavados secuenciales de alcoholes de escala decreciente: tres lavados de 5 minutos de xileno, dos de 5 minutos con etanol absoluto, dos de 5 minutos con etanol al 95%, dos de 2 minutos con etanol al 70%, dos de 2 minutos con etanol al 50% y uno de 5 minutos con agua MilliQ.

Posteriormente, los tejidos seccionados de tres regiones seleccionadas del seno aórtico-inicio de aorta para cada ratón fueron sometidos a una tinción de hematoxilina/eosina para determinar el tamaño de la lesión. El protocolo que se siguió para la identificación de núcleos y citoplasma fue el siguiente: inmersión de los cortes solución comercial de hematoxilina de Harris (SIGMA) durante 1 minuto, aclaramiento con agua durante 10 minutos, dos lavados rápidos en solución de diferenciación (0.25% (v/v) de HCl en etanol al 70%), lavado de 1 minuto en una solución hidroalcohólica de eosina (SIGMA) al 50 %, deshidratación de gradación creciente y montaje con Eukitt (A10500, DELTALAB, Barcelona, España).

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Solución de Hematoxilina de Harris	SIGMA, St. Louis, EE.UU.	HS32
Eosina	SIGMA, St. Louis, EE.UU.	E4382

Tabla 4. Reactivos de tinción histológica: hematoxilina/eosina

La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara integrada del microscopio Leica DMD108 (LEICA).

1.5. Caracterización de la placa de ateroma

Para la caracterización de la placa de ateroma se emplearon técnicas básicas de histología, así como también de inmunohistoquímica en los cortes transversales hidratados tal y como se realizó en el apartado 1.4.2.

Los cortes histológicos hidratados fueron sometidos a diferentes tratamientos que incluyeron desenmascaramiento de antígeno seguido de incubaciones con anticuerpos y revelados o bien incubaciones con reactivos histológicos para la determinación de estructuras. Tras las tinciones en todos los casos se procedió a tres lavados de 5 minutos con PBS1X para eliminar el exceso de reactivo que pudiera haber quedado en el tejido y montaje acuoso o no acuoso según

Material y métodos

indicado. Todas las incubaciones y pasos se realizaron a temperatura ambiente (TA) menos en los indicados de manera específica.

La captura de imágenes se llevó a cabo del mismo modo que en el apartado 1.4.2; mientras que la captura de imágenes con inmunofluorescencia se realizó con microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI3000B (LEICA, Wetzlar, Germany). Y, en ambos casos, la cuantificación se llevó a cabo con el programa de análisis de imagen Fiji.

1.5.1. Cuantificación del contenido en macrófagos en la placa de ateroma

Para la detección de macrófagos se utilizó un anticuerpo comercial frente al antígeno específico de macrófagos Mac-3 (Tabla 5). Los cortes histológicos, una vez desparafinados e hidratados, fueron sometidos a bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ (0.3%) en PBS1X durante 30 minutos. A continuación, se realizó el bloqueo de interacciones no específicas durante 90 minutos con una solución de bloqueo de PBS1X-suero de caballo al 5% y la incubación con el anticuerpo primario anti-Mac-3 (dilución 1/200 en solución de bloqueo) a 4°C durante toda la noche. Tras tres lavados con PBS1X se realizó una incubación en anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado a biotina la Tabla 6 (diluido 1/300 en solución de bloqueo) durante 1 hora. Para la detección del inmunocomplejo se realizó una incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP, Horseradish Peroxidase) diluida 1/2 durante 10 minutos, y revelado de la tinción con DAB (diaminobencidina), que genera un precipitado marrón en presencia del enzima HRP (Tabla 6). Esta inmunotinción fue completada con una contratinción de los núcleos celulares con hematoxilina de Harris seguida de deshidratación mediante lavados de 2 minutos en alcoholes de gradación creciente (etanol al 70%, etanol al 95%, etanol absoluto y xileno) para montaje no acuoso en medio comercial Eukitt (DELTALAB). La cuantificación del contenido de macrófagos en la placa de ateroma se expresó como porcentaje del área de la lesión positiva para Mac-3 relativizando al área de lesión y como área absoluta (mm²).

1.5.2. Análisis de los marcadores iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) y arginasa I en la placa de ateroma

Para la determinación de los marcadores iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) y arginasa I (Tabla 5), los cortes histológicos rehidratados, fueron sometidos a exposición del antígeno en tampón citrato de sodio (10mM, pH 6.5 a alta presión y temperatura) y a bloqueo de la actividad peroxidasa tal y como se indicó en el apartado anterior. Tras los lavados y el bloqueo de interacciones inespecíficas con suero de caballo al 5%, las muestras histológicas se incubaron en los anticuerpos primarios anti-iNOS (dilución 1/100 en solución de bloqueo) y anti-Arginasa I (dilución 1/50 en solución de bloqueo) a 4°C y durante toda la noche. Al día siguiente, tras tres lavados con PBS1X, se procedió a realizar la incubación de las muestras con anticuerpo

secundario anti-IgG de conejo biotilado (Tabla 6) (dilución 1/300 en solución de bloqueo), durante 1 hora. La detección del inmunocomplejo, la contratinción de los núcleos celulares, la posterior deshidratación de las muestras y el montaje se realizó de la misma manera que en el apartado 1.5.1. El contenido de los marcadores se expresó como porcentaje del área de la lesión positiva para iNOS o Arg1 relativizando al área de lesión y en área absoluta (mm²).

1.5.3. Análisis del contenido de metaloproteinasa 9 (MMP9) en placa de ateroma

Para la detección de la MMP9 en la placa aterosclerótica se utilizó un anticuerpo comercial MMP9 (Tabla 5). Los cortes histológicos fueron desparafinados e hidratados y sometidos a exposición del antígeno y bloqueo de la actividad peroxidasa tal y como se indicó en el apartado 1.5.1.

Tras lavado de las muestras y bloqueo de interacciones no específicas, tal y como se ha descrito anteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-MMP9 (dilución 1/200 en solución de bloqueo) a 4°C, durante toda la noche. Tras tres lavados con PBS1X, se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotilado (Tabla 6) en dilución 1/300 en solución de bloqueo durante 1 hora. La detección del inmunocomplejo, la contratinción de los núcleos celulares, la deshidratación de las muestras y el montaje se realizó como en el apartado 1.5.1. El contenido de los marcadores se expresó como porcentaje del área de la lesión positiva para iNOS o Arg1 relativizando al área de lesión y en área absoluta (mm²).

1.5.4. Cuantificación del contenido de células T en placa de ateroma

La detección del infiltrado de células T en la lesión de inicio de aorta se realizó con una inmunofluorescencia. Tras hidratarlos, los cortes histológicos se sometieron a exposición del antígeno en tampón Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9) y a bloqueo de interacciones inespecíficas en suero de caballo al 5% durante 30 minutos a TA. A continuación, los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche con un anticuerpo policlonal humano frente al marcador de linfocitos CD3 (Tabla 5) en dilución 1/75 en solución de bloqueo y, tras dos lavados con PBS1X, se incubó en el anticuerpo secundario anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 (Tabla 6) en dilución 1/200.

Para la contratinción del núcleo celular se utilizó 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) y los cortes se montaron con el reactivo Slow-Fade Gold reagent (Tabla 6). Las capturas de las imágenes inmunofluorescentes se realizó con el microscopio invertido de fluorescencia y, posteriormente se realizó la cuantificación del número de células positivas para el marcador CD3 en la zona de lesión y se expresó como número de células por μm^2 de lesión.

Material y métodos

1.5.5. Cuantificación del contenido de células de músculo liso vascular en la placa de ateroma

La detección y cuantificación de células de músculo liso vascular (cMLVs), se realizó mediante una inmunotinción usando un anticuerpo monoclonal comercial frente a la α -actina de músculo liso, SM- α -actina. De manera similar a las tinciones anteriores los cortes fueron desparafinados e hidratados y sometidos a bloqueo de las interacciones no específicas con PBS1X-suero de caballo al 5% durante 1 hora. Seguidamente, los cortes se incubaron en el anticuerpo primario SM- α -actina, dilución 1/20, conjugado directamente a fosfatasa alcalina (Tabla 5) y se dejaron a 4°C durante toda la noche. Tras tres lavados con PBS1X, los cortes histológicos se revelaron empleando el sustrato comercial Fast Red (SIGMA) que genera un precipitado rosado-rojizo al reaccionar con la fosfatasa alcalina y, posteriormente, se procedió al montaje en glicerol gelatina (GG1, SIGMA). Tras la toma de imágenes se cuantificó el contenido en cMLVs y el resultado se expresó como el porcentaje del área de la lesión positiva para SM- α -actina relativa al área total de la lesión y bien como área absoluta (mm²).

1.5.6. Cuantificación del contenido de fibras elásticas en la placa de ateroma

La detección de fibras elásticas en la zona de lesión aterosclerótica se realizó mediante la tinción de los cortes histológicos de aorta desparafinados e hidratados con el reactivo Verhoeff-Van Gieson con un kit comercial (BIO-OPTICA, Milán, Italia), en el cual las fibras elásticas se tiñen de rojo violáceo a marrón, los núcleos celulares se tiñen en negro con hematoxilina de Weigert y el colágeno se tiñe en varios tonos de rojo. Tras deshidratación, el montaje de los cortes se realizó con el medio comercial Eukitt tal y como está indicado en el apartado 1.5.1. La captura de imágenes y el análisis se realizó como anteriormente se ha explicado, expresándose el contenido de fibras elásticas en la placa de ateroma como porcentaje del área de elastina relativa al área de lesión.

1.5.7. Cuantificación del contenido en colágeno, capa fibrosa y núcleo necrótico

Para la determinación de colágeno en la placa de ateroma, el área de núcleo necrótico y el grosor de la capa fibrosa se empleó la tinción tricrómica de Masson utilizando un kit comercial (BIO-OPTICA, Milán, Italia) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El montaje, la captura y el análisis de imágenes se realizó como en el apartado 1.5.1. El contenido de colágeno se expresó como porcentaje del área de colágeno relativo al área total y en área absoluta en (μm^2). El núcleo necrótico se expresó como área absoluta (μm^2) y la capa fibrosa como la media de al menos 5 medidas de grosor (μm) desde los núcleos necróticos al lumen por imagen.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Referencia
Anti-Mac-3 (LAMP-2)	Monoclonal de rata	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Santa Cruz, CA, EEUU	sc-19991
Anti-iNOS	Policlonal de conejo	ABCAM Cambridge, Reino Unido	ab15323
Anti-Argl	Policlonal de conejo	SIGMA, St. Louis, EE.UU.	AV45673
Anti-MMP-9	Policlonal de conejo	UPSTATE - Millipore, Billerica, MA, EEUU	AB19016
Anti-SMα-actin	Monoclonal 1A4	SIGMA, St. Louis, EE.UU.	A5691
Anti-CD3	Monoclonal de conejo	DAKO, Santa Clara, CA, EEUU	A0452
Anti-F4/80	Monoclonal de rata	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EEUU	MCA497G

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias

Todos los anticuerpos se validaron realizando controles negativos en los cuales se omitía el anticuerpo primario.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia
Goat anti-rat IgG biotinilado	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Santa Cruz, EE.UU.	sc-2041
Goat anti-rabbit biotinilado	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Santa Cruz, EE.UU.	sc-2040
Estreptavidina-HRP	ABCAM Cambridge, Reino Unido	Ab7403
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	LIFE TECHNOLOGIES Thermofischer, CA, EEUU	A21206
DAB	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Reino Unido	BUF021A
DAPI	LIFE TECHNOLOGIES Thermofischer, CA, EEUU	D1306
Eukitt	DELTA LAB, Barcelona, España	A10500
Fast Red	SIGMA, St. Louis, EE.UU.	F-4648
Slow-Fade Gold	INVITROGEN (Thermofisher), Carlsbad, CA, EEUU	S36936

Tabla 6. Anticuerpos secundarios y reactivos empleados en inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias

2. Caracterización de parámetros inflamatorios

2.1. Análisis de citoquinas circulantes

Las citoquinas se midieron en plasma aislado por centrifugación de sangre heparinizada (10 U heparina /ml) a 13.500g durante 30 minutos a 4°C. Las determinaciones de los niveles de citoquinas se midieron mediante técnicas de ELISA utilizándose para ello los "DuoSET ELISA kits" (R&D SYSTEMS, Minneapolis, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante para las citoquinas MCP1 y TNF α .

2.2. Caracterización de las células circulantes en sangre mediante citometría de flujo

Para la caracterización de las células circulantes se empleó citometría de flujo en sangre entera. Todos los anticuerpos y reactivos empleados se muestran en la Tabla 7. El protocolo general fue incubación de la sangre entera con los anticuerpos en oscuridad a TA durante 30 min seguido de incubación con 250 μ l tampón de lisis (BD FACS™ lysing solution) para el lisado de los eritrocitos y fijado de la muestra durante 15 minutos a TA y análisis con los citómetros FACSVerse o FORTRESSA (BD BIOSCIENCES, CA, EEUU).

Para determinar las diferentes **poblaciones leucocitarias circulantes y los subtipos de monocitos** se incubaron 10 μ l de sangre heparinizada con los anticuerpos murinos anti-CD45, anti-Ly6C y anti-CD115 durante 30 minutos a TA. Los linfocitos, monocitos y neutrófilos se determinaron mediante el marcador CD45 y las subpoblaciones monocitarias Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} fueron determinadas dentro de la población doble positiva para los marcadores de monocitos CD115 y leucocitario CD45.

Para el **análisis de los linfocitos**, se añadió 5 μ l de tampón Brilliant Stain a 10 μ l de sangre heparinizada, seguido de los anticuerpos, anti-CD4, anti-CD8a, anti-CD69 y anti-CD3e seguido de la lisis y el análisis tal y como se ha explicado anteriormente. Mediante este protocolo se determinaron las poblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ totales y sus respectivas activaciones, CD3+CD69+, CD4+CD69+ y CD8+CD69+.

Para la determinación de **los diferentes subtipos de linfocitos Th**, se emplearon 30 μ l de sangre heparinizada y se incubaron con los anticuerpos anti-CCR4 (CD194), anti-CD4, anti-CXCR3 (CD183) y anti-CCR6 (CD196). Los linfocitos Th se determinaron a partir de las células CD4+ y, de estas, se obtuvieron las subpoblaciones Th1 CXCR3+, Th2 CCR6-CCR4+, Th9 CCR6+CCR4- y Th17 CCR6+CCR4+.

Para la **determinación de los linfocitos Treg** se incubaron 50 μ l de sangre heparinizada con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 durante 30 min a TA. Tras ello, se realizó la

fijación/permeabilización de las células con 1ml del tampón “*Kit FoxP3 Staining buffer Set*” (MILTENYI BIOTEC) correspondiente durante 30 minutos a 4°C. Tras lavar la muestra mediante centrifugaciones a 300g, las células se incubaron con el anticuerpo anti-Foxp3 usando el tampón de permeabilización durante 30 minutos a 4°C. Tras otro lavado, se realizó el lisado y fijación como anteriormente se ha descrito. La población Treg fue identificada como la población celular CD4+CD25+Foxp3+.

Para el análisis de **neutrófilos, linfocitos B y células NK** se añadieron 5µl de tampón Brilliant Stain a 30µl de sangre heparinizada y se incubaron con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-CD19, anti-Ly6G y anti-NK1.1. A continuación se realizó el lisado de eritrocitos y el análisis en Fortessa Flow cytometers (BD BIOSCIENCES). La población de neutrófilos se identificó como la población celular Ly6G+. Dentro de la población de linfocitos mediante los parámetros SSC y FSC, se identificaron la población de linfocitos B como células CD19+, las células NKT como CD3+NK1.1+ y las células NK como las CD3-NK1.1+.

Material y métodos

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Referencia
Anti-Ly6C PerCP	Monoclonal de rata	BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	560525
Anti-CD45 FITC	Monoclonal de rata	BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	553080
Anti-CD115 APC	Monoclonal de rata	BIOLEGEND, San Diego, CA, EEUU	135509
Anti-CD4 Brilliant violet (BV)	Monoclonal de rata	BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	562891
Anti-CD8a Brilliant violet (BV)	Monoclonal de rata	BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	563068
Anti-CD69 phycoerythrin (PE)	Monoclonal de rata	BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	553237
Anti-CD3e allophycocyanin	Monoclonal de hamster	BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	553066
Brilliant Stain Buffer		BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	563794
Anti-CD25 APC	Ig recombinante humano	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-108-997
Anti-Foxp3 PE	IgG1 recombinante humano	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-093-014
FoxP3 Staining Buffer Set		MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-093-142
Anti-CD4 FITC	Monoclonal de rata	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-102-541
Anti-CCR4 (CD194) BV421	Monoclonal de hamster	BIOLEGEND, San Diego, CA, EEUU	131217
Anti-CXCR3 (CD183) APC	Monoclonal de hamster	eBIOSCIENCE (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	17-1831-80
Anti-CCR6 (CD196) PEVio770	IgG recombinante humano	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-103-818
Anti-Ly-6G-APC-Vio770	IgG1 recombinante humano	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-119-126
Anti-F4/80 APC	Monoclonal de rata	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EEUU	MCA497APCT
Anti-CD11c PE	Monoclonal de hamster	eBIOSCIENCE (Thermofisher), Waltham, MA, EEUU	12-0114-81
Anti-CD206 AlexaFluor488	Monoclonal de rata	AbD SEROTEC (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA, EEUU	MCA2235A488T
Anti-CD19-VioBlue	IgG1 recombinante humano	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-112-041

Anti-NK1.1-PerCP-Vio700	Isotipo de ratón IgG2ak	MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach, Alemania	130-117-773
Facs Lysing Solution		BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU	349202

Tabla 7. Anticuerpos y reactivos utilizados en citometría de flujo.

3. Caracterización histopatológica del hígado

En el hígado se determinó el contenido de triglicéridos, el contenido de macrófagos y se realizó la caracterización histopatológica en cortes histológicos consecutivos de 5µm de grosor. La desparafinación e hidratación de los tejidos se realizó sometiéndolos a una cadena de lavados secuenciales de xileno y alcoholes en escala decreciente, tal y como se indica en la Tabla 8.

La caracterización del hígado se basó en técnicas básicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y la captura de imágenes se realizó como en el apartado 1.5.

Desparafinación e hidratación	Tiempo
Xileno	3 lavados por 5 minutos
Etanol absoluto	2 lavados de 5 minutos
Etanol 95%	2 lavados de 5 minutos
Etanol 70%	2 lavados de 2 minutos
Etanol 50%	2 lavados de 2 minutos
Agua MilliQ	1 lavados de 5 minutos

Tabla 8. Protocolo de desparafinación y rehidratación de cortes histológicos

3.1. Determinación del contenido de triacilglicéridos hepáticos

Para el análisis del contenido de triacilglicéridos en tejido hepático se siguió el método empleado en Norris *et al.* (2003) [79]. Entre 90-120mg de tejido fueron sometidos a digestión y posterior saponificación en 350µl de hidróxido de potasio etanólico durante toda la noche a 55°C. Al día siguiente, las muestras se llevaron a un volumen final de 1000µl con H₂O:EtOH (v/v) y se centrifugaron a 13.500g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se separó y se diluyó hasta un volumen de 1200µl de H₂O:EtOH (v/v), del cual, 200µl se precipitaron con 215µl de MgCl₂ 1M durante 10 minutos en hielo.

Tras centrifugar la muestra a 13500g durante 5 minutos se determinó el contenido en glicerol con 3µl del sobrenadante, usando para ello el reactivo "Free Glycerol Reagent" (SIGMA), cuyo

Material y métodos

producto es una quinoneimina que absorbe a un máximo de 540nm y es proporcional a la cantidad de glicerol libre de la muestra.

El cálculo del contenido de triacilglicerol en hígado se realizó en base a la fórmula para el contenido en equivalentes de trioleína:

$$\text{CET} = \text{CTG (mg/dl)} * 415 / 200 * 0.012 \text{ (dl)} / \text{peso en gramos} * 9.61$$

CET: contenido en equivalente de trioleína

CTG: contenido de triacilgliceroles

3.2. Determinación celular en hígado mediante citometría de flujo

El análisis del contenido en macrófagos totales y subtipos hepáticos, también llamados células de Kupffer, y de los linfocitos se realizaron mediante citometría de flujo. Los anticuerpos específicos de macrófagos y los reactivos empleados se encuentran en la Tabla 7.

3.2.1. Aislamiento de células de hígado

Para la determinación de células inmunes hepáticas, se extrajeron entre 0.2 y 0.25 gramos de tejido hepático y se trocearon con una tijera. La digestión del tejido se realizó con 4,5mg/ml de colagenasa tipo I (LS004194, WORTHINGTON, Lakewood, NJ, USA) diluida en medio de cultivo RPMI y 10% de suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) durante 30 minutos y en baño a 37°C con agitación manual. El tejido disgregado se filtró empleando un filtro de 40µl de nylon (431750, Corning, NY 14831 EEUU) y el volumen total recogido se centrifugó a 500g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 500µl en tampón de lisis RBC (555899, BD BIOSCIENCES) a TA durante 5 minutos. Tras lavar con tampón de lisis (BD FACS™ lysing solution) y centrifugar a 500g durante 10 minutos a 4°C se descartó nuevamente el sobrenadante y se incubó con Zombi UV fixable viability kit (BIOLEGEND, San Diego, CA, EEUU) durante 20 minutos a TA y en oscuridad. Posteriormente los tubos fueron lavados con PBS1X y 2% de suero bovino fetal y se centrifugaron nuevamente, añadiéndole al pellet resultante 200µl de FcR Blocking Reagent Mouse (MILTENYI BIOTEC).

3.2.2. Determinación de macrófagos en hígado

Del extracto celular de hígado obtenido en el apartado anterior se empleó un volumen de 10µl que se incubó con los anticuerpos anti-F4/80, anti-CD11c y anti-CD206, tal y como se detalla en el apartado 2.2. Seguido de una incubación con 300µl tampón de lisis (BD FACS™ lysing solution) para el lisado de los eritrocitos y fijado de la muestra durante 10 minutos a TA y posterior análisis con el citómetro FORTESSA (BD BIOSCIENCES, CA, EEUU).

La población de macrófagos M1 proinflamatorios fue identificada como la población celular F4/80+CD11c+CD206-, siendo identificados los macrófagos alternativos M2 antiinflamatorios como las poblaciones F4/80+CD11c-CD206+.

3.3. Determinación de la fibrosis hepática

Para la cuantificación de la fibrosis, los cortes histológicos de hígado se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson utilizando un kit comercial (BIO-OPTICA, Milán, Italia) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el porcentaje del área de colágeno relativo al área total (μm^2).

3.4. Determinación de la esteatosis hepática

Para examinar la acumulación de gotas lipídicas en el hígado de ratón se realizó una tinción de hematoxilina/eosina en cortes desparafinados e hidratados del tejido hepático. El protocolo a seguir fue el siguiente: inmersión de los cortes en una solución comercial de hematoxilina de Harris (Tabla 4), aclaramiento con agua durante 5 minutos, 2 lavados rápidos en solución de diferenciación (0.25% (v/v) de HCl en etanol al 70%), un lavado de 2 minutos en una solución hidroalcohólica de eosina al 50 % (Tabla 4), deshidratación mediante inmersión durante 2 minutos en alcoholes de gradación creciente (etanol al 50%, etanol al 70% y etanol absoluto), lavado de 2 minutos en xileno y montaje con Eukitt (DELTALAB).

La determinación de la esteatosis se realizó mediante el tamaño medio de las gotas lipídicas por ratón y el número de células con gotas lipídicas por el área total del hígado [77]. Los parámetros de cuantificación del grado de severidad de la EHGNA empleados se detallan en la Tabla 9. Estos parámetros se valoran en base a una puntuación que determina el grado de severidad de la enfermedad o NAS (del inglés *NAFLD activity score*).

PARÁMETROS	DEFINICIÓN	PUNTUACIÓN
Esteatosis	<5%	0
	5-33%	1
	33-66%	2
	>66%	3
Inflamación lobular	Sin focos (~3mm ² área)	0
	<2 focos (~3mm ² área)	1
	2-4 focos (~3mm ² área)	2
	>4 focos (~3mm ² área)	3
Degeneración balonizante	Ninguna célula	0
	Alguna célula	1
	Muchas células	2

Tabla 9. Puntuación de la actividad NAS

3.5. Determinación del contenido de linfocitos T hepáticos

El análisis del contenido en linfocitos T en tejido hepático se realizó empleando el mismo protocolo que en el apartado 1.5.4.

Tras la toma de imágenes se cuantificó el número de células T, es decir, células positivas para el marcador CD3 por área de hígado (células/ μm^2).

4. Estudios *in vitro* en células derivadas de ratón

4.1. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea de ratón

El crecimiento y manipulación de cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar de bioseguridad 11-A con condiciones constantes de temperatura (37°C) y concentración de CO₂ (5%). Las células se cultivaron con medios en los cuales había presente penicilina (100U/ml), estreptomycin (0.1mg/ml) y anfotericina B (indicado como P/S/A).

Los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) se obtuvieron a partir de precursores de médula ósea diferenciados *in vitro* en presencia de M-CSF (*macrophage colony stimulation factor*) como factor de crecimiento y de diferenciación. Para obtener dichos precursores, la médula ósea de fémur y tibia de ratón se sometió a una disgregación mecánica mediante dos

pases a través de una aguja 19G. La suspensión celular resultante se sembró en placas de cultivo estándar con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*)-P/S/A, 10% suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) y 10% de medio condicionado de células L929 (LCM, *L929-cell conditioned medium*) como fuente de M-CSF.

Las células progenitoras de médula ósea se plaquearon a una concentración de 3×10^6 células/ml y se cultivaron durante 7 días con cambios de medio de cultivo al tercer y sexto día [80]. El medio LCM se obtuvo del sobrenadante de células L929 mantenidas en confluencia durante 5-7 días con medio DMEM-P/S/A y 10%FBS.

4.2. Cultivo de macrófagos en medio condicionado y análisis de la secreción de citoquinas

Para realizar la caracterización de macrófagos en medio condicionado, en el día 6 de crecimiento, los MDMO fueron tratados durante 24 horas con un medio DMEM/FBS 0.5% (LONZA, Basel, Switzerland) suplementado con: vehículo, $1 \mu\text{m}$ de dapagliflozina, un 10% de plasma obtenido de los ratones tratados con dapagliflozina (medio condicionado dapagliflozina DAPACM) o bien, un 10% de plasma obtenido de los ratones tratados con vehículo (vehículoCM).

Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante y se guardó a -80°C para el posterior análisis de la secreción de citoquinas mediante los kits comerciales DuoSEt ELISA (R&D SYSTEMS).

Tras recoger el sobrenadante y lavar los pocillos con PBS1X frío, las células en cultivo se recogieron mediante raspado de placas de 10cm^2 en presencia de 500ml TRIzol (INVITROGEN) y se guardaron a -80°C .

5. Estudios *ex vivo* en tejidos de ratón

5.1. Aislamiento de islotes pancreáticos para el análisis de secreción de insulina

El aislamiento de islotes pancreáticos se realizó en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* dislocados cervicalmente. Una vez extraído el páncreas, éste fue perfundido *in situ* con una solución de Krebs frío (NaCl 127mM, KCl 5mM, CaCl₂ 3mM, MgCl₂ 1.5mM, NaHCO₃ 24mM, Hepes 6mM, glucosa 2mg/ml, 0.1% albúmina, equilibrado con 5% CO₂ en O₂). A continuación, el órgano se se aisló eliminando la grasa circundante, se troceó y se sometió a digestión en solución de Krebs con colagenasa NB8 (1mg/ml, 17456, SERVA GmbH, Heidelberg, Alemania) en baño a 37°C con agitación manual durante 20 minutos. Tras un lavado en Krebs frío, se centrifugó (800g, 1 minuto) repitiendo este proceso tres veces. Los islotes se aislaron manualmente bajo lupa estereoscópica, en un fondo oscuro, y se recogieron mediante centrifugación (500g, 1 minuto)

Material y métodos

para eliminar el exceso de Krebs tal y como se describe en Andrés-Blasco *et al.* (2015) [76]. Posteriormente, se congelaron en N₂ líquido y se mantuvieron a -80°C hasta la realización de la extracción proteica o bien se sometieron a ensayo de secreción de insulina.

La secreción de insulina se evaluó mediante un ensayo de secreción de insulina estimulada con glucosa. Para ellos, los islotes se incubaron durante 30 minutos a 37°C con una solución KRBH ((NaCl 140mM, KCl 4.5mM, CaCl₂ 2.5mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 20mM, albúmina 0.1%) y 2mg/ml de glucosa. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se incubaron en una solución KRBH con baja concentración de glucosa (2.8 mmol/L) o con KRBH con alta concentración de glucosa (16.7 mmol/L) durante 1h a 37°C.

Se realizaron 4 ensayos por condición (5 islotes/ensayo) y las concentraciones de insulina se midieron mediante un kit de ELISA (CRYSTALCHEM). Para el análisis del contenido en insulina los islotes, éstos se sometieron a lisis mediante un tampón de ácido acético (5.75% acético y 0.1% albúmina) a 100°C durante 10 minutos y, tras centrifugación (12000g, 10 minutos, 4°C), el sobrenadante fue recogido para la determinación de insulina. El índice de secreción de insulina estimulada con glucosa se calculó como la ratio entre la secreción de insulina estimulada con una alta concentración de glucosa y la secreción de insulina estimulada con una baja concentración de glucosa normalizada cada una por el contenido de insulina en los islotes.

5.2. Cultivo de explantes de tejido adiposo para señalización de insulina y análisis proteico

Para los cultivos de explantes de grasa se empleó grasa epididimal de ratones *Irs2*^{+/-} troceada en secciones de 2-3 mm³ e incubada durante 24h en placas de cultivos de 6 pocillos a 100mg/ml con medio DMEM-P/S/A y 10% de FBS en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los explantes fueron lavados dos veces con PBS1X y se incubaron en DMEM-P/S/A y 0.1%FBS en presencia de dapagliflozina 1µM o medio con vehículo como tejido adiposo control.

Los explantes fueron posteriormente estimulados durante 7 minutos con insulina (200nM, Sigma) o salino y fueron congelados instantáneamente en N₂ líquido para realizar el análisis de la vía de señalización de la insulina mediante western blot.

6. Análisis de expresión proteica mediante Western blot

6.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Los extractos de proteínas se obtuvieron de homogeneizar 50mg de los explantes de tejido adiposo tratados como indicado en el apartado 5.2. en presencia de un tampón de lisis (Hepes 50nM, pH 7.5, NaCl 150mM, 10% glicerol y 1% Triton X-100) suplementado con Complete Mini

cocktail (ROCHE, Mannheim, Alemania), β -glicerofosfato 50mM (Sigma), 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Roche), 200 μ M Na_3VO_4 (Sigma) e inhibidores de fosfatasas PhosSTOP (ROCHE). Los homogeneizados pasaron por tres ciclos de congelación-descongelación mediante el uso de N_2 líquido y de baño a 37°C seguido de agitación durante 30 segundos. A continuación, se centrifugaron a 13500g durante 30 minutos a 4°C para eliminar restos no disgregados y el sobrenadante se empleó para la cuantificación de los extractos proteicos usando el método de Bradford [81] con Coomassie Blue G-250 (BIO-RAD Laboratories), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El producto resultante de la reacción con la proteína genera un compuesto azulado con absorbancia a 595nm de longitud de onda y que es proporcional a la cantidad de proteína. Las concentraciones se obtuvieron mediante una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA (del inglés *bovine serum albumin*) en un rango de entre 0.25 y 2 μ g/ μ l que se utilizó para interpolar los valores de absorbancia de las muestras y obtención de las concentraciones.

6.2. Análisis de expresión proteica con SDS-Page y Western blot

El análisis de proteínas de los diferentes extractos proteicos se realizó con electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (del inglés *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), Western blot e inmunodetección tal y como se describe en “*Current Protocols in Protein Science*” [82].

La electroforesis SDS-PAGE permite la separación de proteínas que poseen carga negativa por el SDS. Las muestras se cargan en pocillos situados en el ánodo y, tras ser sometidas a un campo eléctrico, la separación de proteínas se realiza en base a su peso molecular. Para ello, previamente a la carga del gel, los extractos proteicos se diluyeron en agua milliQ y laemmli en presencia de SDS y se pusieron a 95°C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización de proteínas y hacer constante su relación carga/masa. Se utilizó un sistema vertical de electroforesis discontinua con geles de poliacrilamida en dos fases, una primera fase al 12% para la separación de proteínas y un gel superior con concentraciones de bandas de poliacrilamida al 4%. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por 25mM Tris, 192mM glicina y 0.1% SDS durante 90 minutos a un voltaje variable entre 80 y 120V. La transferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a la membrana Immobilon-P de Polifluoruro de vinilideno (PVDF, MERCK, Kenilworth, NJ EEUU) se realizó con un sistema MiniProtean (BIO-RAD LABORATORIES) en frío durante 90 minutos a 100V constantes y en un tampón compuesto por 25mM Tris, 192mM glicina y 20% metanol (pH 8.3). Tras la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo consistente en 0.1% BSA en PBS1X con 0.05% Tween 20 durante 1 hora a TA en agitación. La incubación con los anticuerpos específicos que se muestran en las Tabla 10 y Tabla 11 se realizó en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos en TPBS1X (0.05% Tween-20 en PBS1X) para

Material y métodos

eliminar los restos de anticuerpo primario y las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP durante 1 hora a TA. La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL-Plus y empleando el sistema de adquisición y análisis de imagen Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (FUJIFILM, Tokio, Japón).

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Referencia
Anti-fosfo-Akt (Ser473)	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING, Danvers, MA, EEUU	9271
Anti-Akt1/2	Policlonal de cabra	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, CA, EEUU	sc1619
Anti-β-actina	Monoclonal de ratón	SIGMA, St. Louis, EEUU	A5441

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Referencia
Goat anti-mouse IgG-HRP	Producido en cabra	DAKO, Brüsseler straÙe, Berlín, Alemania	P0447
Donkey anti-goat IgG-HRP	Producido en burro	SANTACRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, CA, EEUU	sc2056
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Producido en cabra	SIGMA, St. Louis, EEUU	P0488
ECL prime Western Blotting Detection Reagent		GE HEALTHCARE, Chicago, IL, EEUU	RNP2236

Tabla 11. Anticuerpos secundarios y reactivos utilizados en Western blot

7. Estudio de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

7.1. Obtención y cuantificación de extractos de ARN

Para la obtención del ARN de los diferentes tejidos se utilizó el reactivo TRIzol Reagent (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU). Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, se añadieron 0.2ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol para inducir la separación de fases mediante centrifugación (12.000g a 4°C durante 15 minutos). El ARN se precipitó desde la fase acuosa con isopropanol mediante una incubación overnight a -20°C seguido de un lavado del ARN precipitado con etanol al 75%. Tras secado al aire, el ARN se resuspendió en agua libre de

ADNasa/ARNasa (SIGMA) ultrapura comercial y se cuantificó en un Nanodrop (THERMO SCIENTIFIC) mediante medida espectrofotométrica a 260nm de longitud de onda.

La pureza se estimó en base a la relación A_{260}/A_{280} , siendo esta superior a 1.8 en todos los extractos analizados. El extracto de ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su análisis. En todo momento, a lo largo del protocolo de extracción de ARN, se emplearon reactivos y tubos libres de ARNasas.

7.2. Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) se emplearon entre 0.5-1 μg de ARN total de cada muestra que se retrotranscribió usando el kit comercial “*Maxima First Strand cDNA Synthesis kit*” (FERMENTAS, Waltham, MA, EEUU) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para la amplificación del ADNc y análisis de expresión génica por qPCR (del inglés, *quantitative PCR*) se empleó el kit “*Luminars Color HiGreen (High ROX)-qPCR Master Mix*” (FERMENTAS) y el termociclador 7900Fast System (APPLIED BIOSYSTEM, Foster City, CA, EEUU). Los cebadores específicos para cada gen murino que se emplearon para el estudio se muestran en la Tabla 12 y se obtuvieron de la base de datos *PrimerBank PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification* del Massachusetts General Hospital de la Harvard Medical School (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). La cuantificación de la expresión génica relativa se realizó a partir de la comparación entre una muestra referencia y una muestra control, obteniéndose así la magnitud de las variaciones en los niveles de expresión génica de un gen respecto a otro usado como referencia. La cuantificación emplea un valor del ciclo umbral (Ct) mediante el método del $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ que permite hallar la relación entre los valores Ct de la muestra y de la muestra control basándose en la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct referencia})} \rightarrow \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

La transformación $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ elimina variaciones debidas al efecto “tubo” (diferencias causadas por degradación parcial de ARN en alguna muestra, errores en pipeteo, etc) gracias a que incluye un control endógeno, consiguiéndose un valor que es directamente proporcional a la cantidad total de transcrito de cada gen. De esta forma, se pueden comparar cantidades de expresión de un gen respecto a otro dentro de un mismo grupo o entre grupos. Siguiendo este método los niveles de ARNm de cada gen se normalizaron a los niveles del ARNm del control endógeno, el gen *ciclofilina* y la expresión de los genes fue relativizada a las muestras control (RQ=1 para el control) en cada experimento [83].

Material y métodos

Gen	Cebador	Secuencia 5'→3'
Abca1	Forward	CAGATGAAGCAGTTTTTCAGTCCT
	Reverse	CACATTCCGGCTCTTTAGAAGG
Abcg5	Forward	AGAGGGCCTCACATCAACAGA
	Reverse	CTGACGCTGTAGGACACATGC
Acox	Forward	TAACTTCCTCACTCGAAGCCA
	Reverse	AGTTCCATGACCCATCTCTGTC
Acta2	Forward	GTCCAGACATCAGGGAGTAA
	Reverse	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
Cd11c	Forward	ATGGAGCCTCAAGACAGGAC
	Reverse	GGATCTGGGATGCTGAAATC
Cd206	Forward	GCATGGGTTTTACTGCTACTTGATT
	Reverse	CAGGAATGCTTGTCATATCTGTCTT
Cd36	Forward	ATGGGCTGTGATCGGAAGT
	Reverse	GTCTTCCAATAAGCATGTCTCC
Chrebp	Forward	AGATGGAGAACCGACGTATCA
	Reverse	ACTGAGCGTGCTGACAAGTC
Ciclofilina	Forward	TGGAGAGCACCAAGACAGACA
	Reverse	TGCCGGAGTCGACAATGAT
Col1a1	Forward	GCTCCTCTTAGGGCCACT
	Reverse	CCACGTCTCACCATTGGGG
Cyp7a1	Forward	GGGATTGCTGTGGTAGTGAGC
	Reverse	GGTATGGAATCAACCCGTTGTC
Fasn	Forward	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
	Reverse	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
Fxr	Forward	GCTTGATGTGCTACAAAAGCTG
	Reverse	CGTGGTGATGGTTGAATGTCC
G6pase	Forward	CRACTCGCTATCTCCAAGTGA
	Reverse	GTTGAACCAGTCTCCGACCA
	Forward	GGTGGACGTACTTTTTAACATCGA

<i>Gata3</i>	Reverse	CGTAGCCCTGACGGAGTTTC
<i>Hi</i>	Forward	CCCTGCGGGCCCTATG
	Reverse	TTGGCATCATCAGGAGAAAGG
<i>IL6</i>	Forward	CCCAACAGACCTGTCT
	Reverse	CCAGTTTGGTAGCATCC
<i>Ldlr</i>	Forward	TGACTCAGACGAACAAGGCTG
	Reverse	ATCTAGGCAATCTCGGTCTCC
<i>Lxr</i>	Forward	CTCAATGCCTGATGTTTCTCCT
	Reverse	TCCACCCTATCCCTAAAGCAA
<i>Mcp1</i>	Forward	CTTCCTCCACCACCATGCA
	Reverse	CCAGCCGGCAACTGTGA
<i>Mmp9</i>	Forward	CTGGACAGCCAGACACTAAAG
	Reverse	CTCGAGGCAAGTCTTCAGAG
<i>Pepck</i>	Forward	CTGCATAACGGTCTGGACTTC
	Reverse	CAGCAACTGCCCGTACTCC
<i>Pgc1a</i>	Forward	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT
	Reverse	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG
<i>Ppara</i>	Forward	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC
	Reverse	ACTGGTAGTCTGCAAACCAAA
<i>Pparg</i>	Forward	GGAAGACCACTCGCATTCTT
	Reverse	GTAATCAGCAACCATTGGGTCA
<i>Rorc</i>	Forward	GACCCACACCTCACAAATTGA
	Reverse	AGTAGGCCACATTACACTGCT
<i>Srbepc1</i>	Forward	GCCAGGGAACCGCTTATATG
	Reverse	CTGGGCTGAGCAATACAGTTC
<i>Tgfb1</i>	Forward	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC
	Reverse	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
<i>Timp1</i>	Forward	GCAACTCGGTGGTCATAA
	Reverse	CGGCCCGTGATGAGAAACT
	Forward	CCCACACCGTCAGCCGATTT

Material y métodos

TNFα	Reverse	GTCTAAGTACTTGGGCAGATTGACC
Zbtb16	Forward	CTGGGACTTTGTGCGATGTG
	Reverse	CGGTGGAAGAGGATCTCAAACA

Tabla 12. Cebadores empleados en los análisis de expresión génica

8. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron y fueron utilizados a menos que estuvieran fuera de rango de la curva o que las muestras se perdieran durante el procedimiento experimental.

Todos los datos cuantitativos se evaluaron en base a la distribución normal según la prueba D'Agostino-Pearson ómnibus, Shapiro–Wilk test o Kolmogorov–Smirnov test (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU). Las diferencias estadísticamente significadas entre dos grupos se evaluaron mediante el test t-Student no pareado de dos colas o con el test U de Mann-Whitney para las pruebas no paramétricas (Software GraphPad Prism).

Los análisis estadísticos de comparación entre más de dos grupos se realizaron empleando un análisis de varianza unidireccional, la prueba one-way ANOVA (paramétrico), seguido de corrección de Bonferroni o Sidak o Kruskal–Wallis (no paramétrico) seguido de la corrección Dunn's. El test de Grubs se empleó con la finalidad de identificar y eliminar valores atípicos en la muestra (Software GraphPad Prism).

Todos los casos se representaron como la media \pm error estándar de la media incluyendo datos de los dos sexos y las diferencias se consideran estadísticamente significativas para valores $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio del efecto de la dapagliflozina en el metabolismo de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* con resistencia a insulina y aterosclerosis acelerada

1.1. Caracterización metabólica de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo

Con el fin de evaluar el efecto de la dapagliflozina en la homeostasis metabólica ratones *ApoE-/-Irs2+/-* fueron alimentados con una dieta aterogénica alta en grasa y en colesterol. El análisis del peso corporal de ratones tratados con vehículo o con dapagliflozina reveló un incremento tras recibir una dieta aterogénica durante 8 semanas tanto en machos como en hembras sin cambios entre los tratamientos (Figura 9).

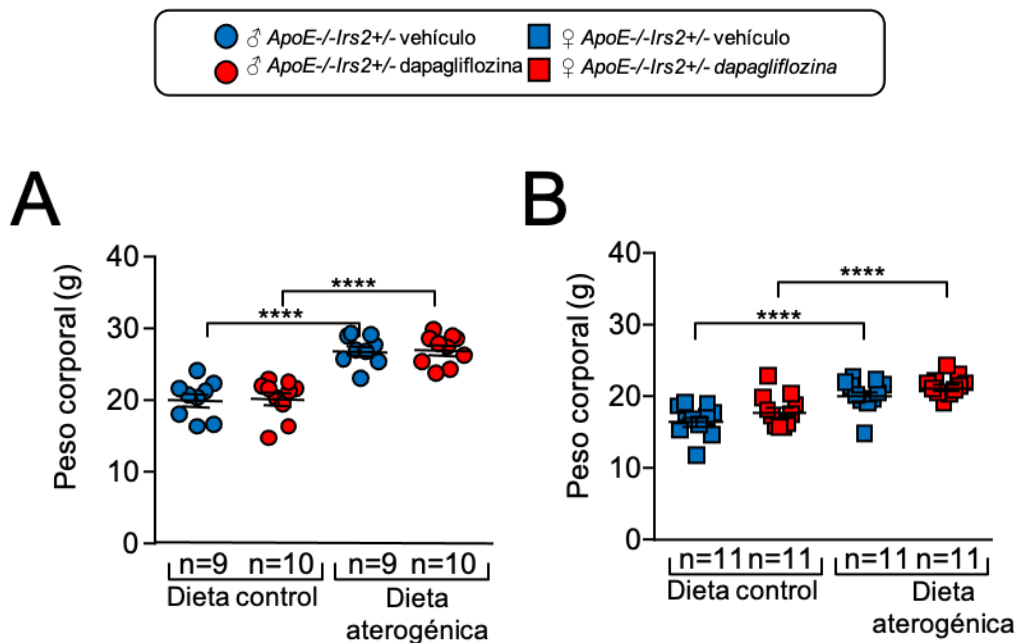


Figura 9. Peso corporal en ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo. Peso corporal (g) antes y después de la dieta aterogénica en machos (A) y hembras (B) de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con vehículo o dapagliflozina. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba *post hoc* de Bonferroni (**** $p < 0.0001$).

Tanto en machos como en hembras, los niveles de glucosa en estado de ayuno permanecieron sin cambios tras la dieta aterogénica y no se vieron afectados por el tratamiento con dapagliflozina (Figura 10A-B).

Resultados

El análisis de los niveles de insulina en estado de ayuno en ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* machos no mostró diferencias significativas entre los tratados con dapagliflozina y con vehículo (Figura 10C). Sin embargo, el tratamiento con dapagliflozina de ratones hembra *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* disminuyó los niveles de insulina en estado de ayuno comparado con los niveles de las hembras del grupo control tratadas con vehículo (Figura 10D).

El tratamiento con dapagliflozina en los ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* no produjo cambios significativos en los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol apoB, colesterol HDL, o de triacilglicéridos (Figura 11).

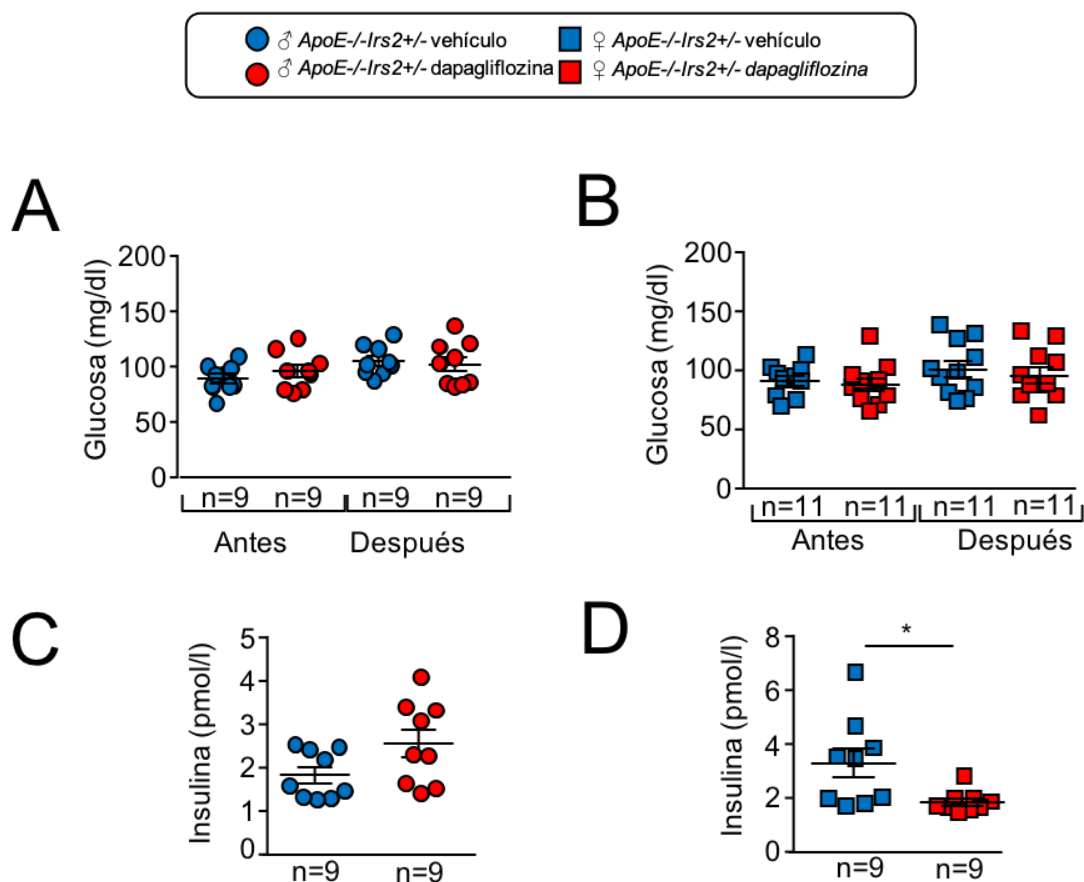


Figura 10. Niveles de glucosa e insulina en estado de ayuno en plasma de ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con dapagliflozina o vehículo. Niveles de glucosa en estado de ayuno en machos y hembras de ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con vehículo o dapagliflozina (A-B). Niveles de insulina en plasma en ayuno tras el tratamiento en ratones macho y hembra *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* (C-d). Los datos se representan como puntos individuales con media±error y los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba *post hoc* de Bonferroni (A y B) y la t de Student's (C) y la prueba U de Mann-Whitney (D) (* $p < 0.05$).

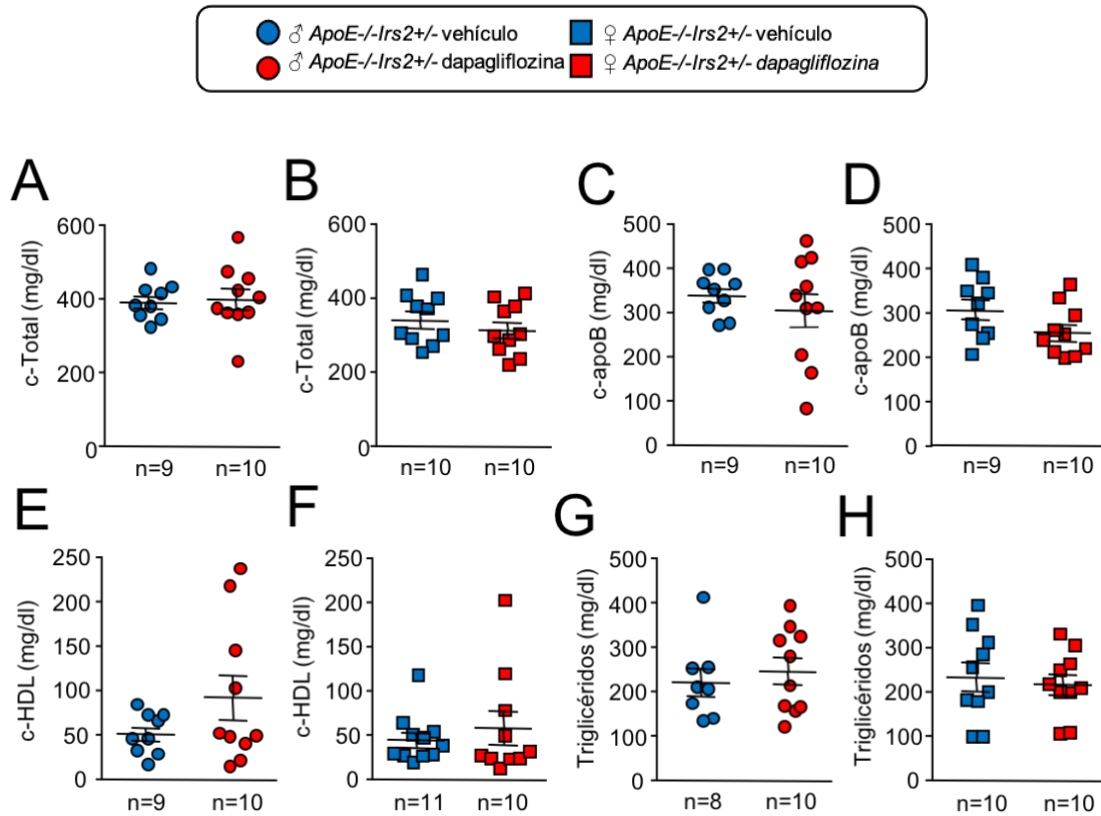


Figura 11. Niveles lipídicos en plasma de ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con dapagliflozina o vehículo durante 8 semanas. Niveles de colesterol total (A-B), colesterol apoB (C-D), colesterol HDL (E-F) y (d) triacilglicéridos (G-H) en ratones macho y hembra *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con vehículo y con dapagliflozina. Los datos se representan como puntos individuales con media ± error y el análisis estadístico se realizó mediante la t de Student (A-E y H) y la prueba U de Mann-Whitney (F y G).

Estudios previos indican un efecto de las gliflozinas en la homeostasis hepática y una mejora en la esteatosis hepática [84]. En el análisis del contenido de triacilglicéridos en el hígado en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} no se observaron diferencias entre los ratones tratados con vehículo y dapagliflozina (Figura 12 A, B) y el análisis inmunohistopatológico mostró una ausencia de gotas lipídicas o de inflamación en el tejido hepático (Figura 12C).

Resultados

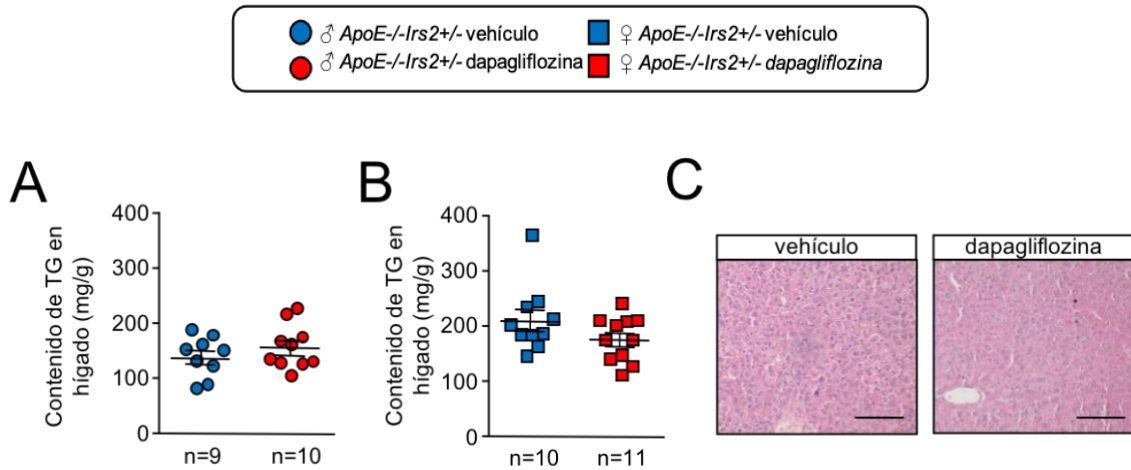


Figura 12. Caracterización hepática de ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con dapagliflozina o vehículo durante 8 semanas. Contenido hepático de triglicéridos expresado en mg/g de tejido hepático en machos (A) y hembras (B). (C) Imágenes representativas de cortes transversales de tejido hepático teñidas en hematoxilina-eosina. Escala: 100µm. Los datos se representan como puntos individuales con media ± error y el análisis estadístico se realizó mediante los tests de t Student's (A) y U de Mann-Whitney (B).

1.2. Efecto de la dapagliflozina en el metabolismo de carbohidratos

El análisis de la tolerancia a la glucosa medida como el parámetro del área bajo la curva (AUC_{glucosa}) durante el TTG mostró valores similares en ambos grupos de tratamiento en los dos sexos (Figura 13A-D). La liberación de insulina durante el TTG se determinó como AUC_{insulina} a los 120 minutos y no presentó diferencias entre el grupo tratado con vehículo y el tratado con dapagliflozina en ambos sexos (Figura 14 A, C, D, F). Sin embargo, el análisis de la insulina liberada en el minuto 30 del test, mostrada como AUC_{insulina} a los 30 minutos, indicó un aumento de la producción de insulina en ratones macho tratados con dapagliflozina comparado con los ratones macho tratados con vehículo (Figura 14 B, E).

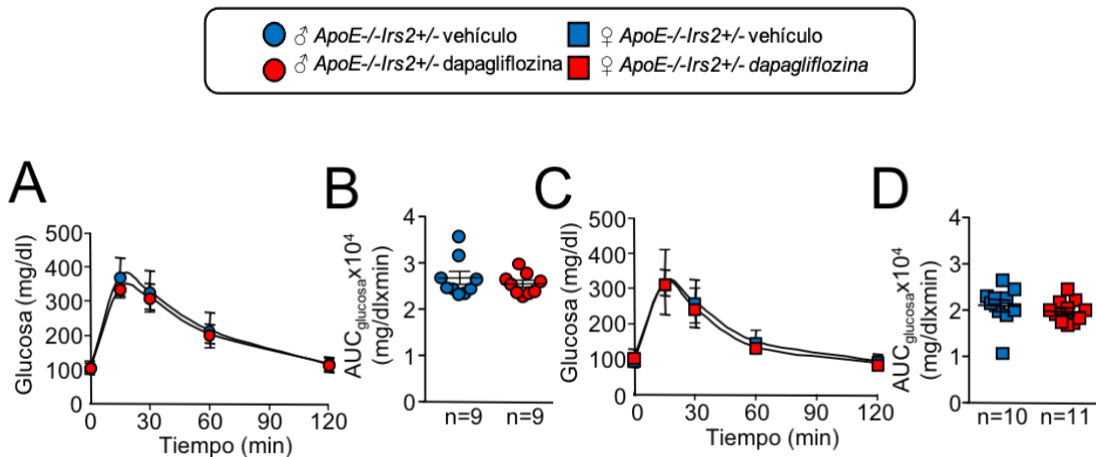


Figura 13. Niveles de glucosa en plasma durante el TTG de ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con dapagliflozina o vehículo. Niveles de glucosa a los diferentes tiempos del TTG (A, C) y área bajo la curva (AUC_{glucosa}) (B, D) calculadas a partir de la curva de la glucosa durante la prueba en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} macho (A, B) y hembras (C, D). Los datos

se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico empleado fue la prueba U de Mann-Whitney.

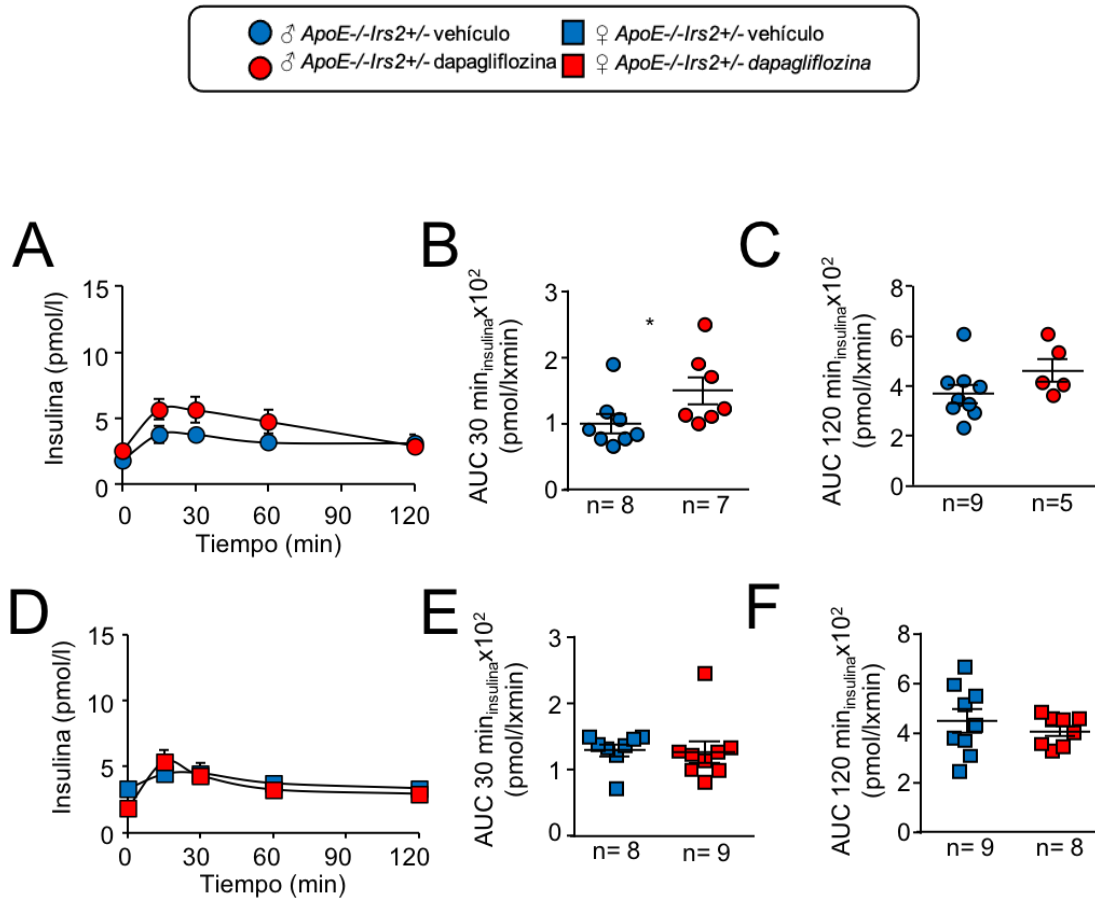


Figura 14. Niveles de insulina en plasma durante el TTG de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo. Niveles plasmáticos de insulina liberados tras estimulación por glucosa a los diferentes tiempos del TTG (A, D). Valores de AUC_{insulina} calculada en los tiempos 30 min (B, E) y 120 minutos (C, F) de la prueba en ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo de en ambos sexos. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y los análisis estadísticos empleados fueron la prueba U de Mann Whitney en todos los casos, excepto para el análisis de AUC_{insulina} a 120 minutos en hembras (F) en el cual se empleó el t de Student´s (*p < 0.05).

Resultados

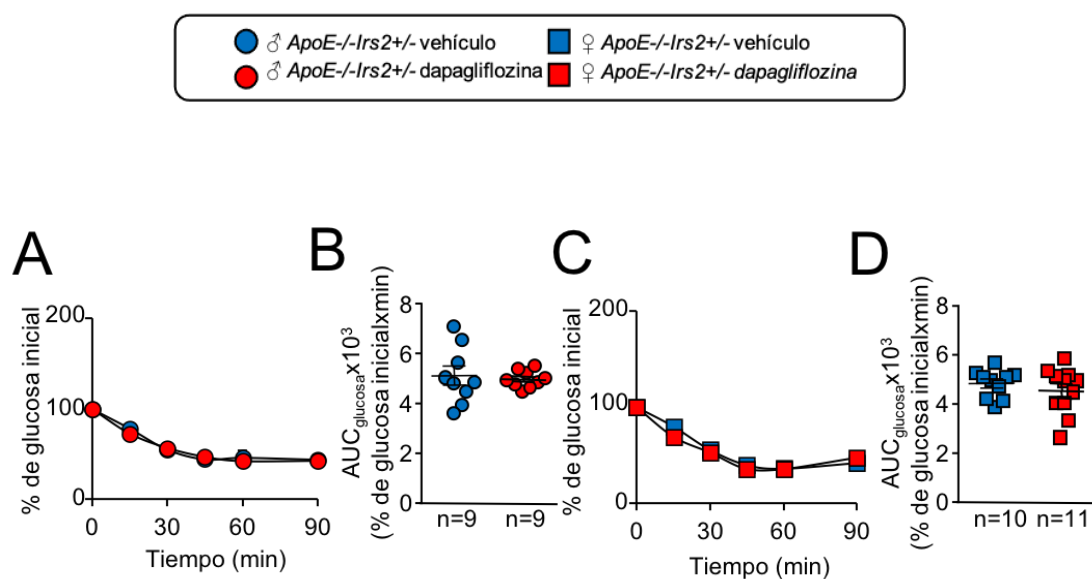


Figura 15. Niveles de glucosa en plasma durante el TTI de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo. (A, C) Niveles de glucosa plasmática (en porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) durante el TTI y (B, D) valores de AUC_{glucosa} en ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tras 4h de ayuno. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's.

Para una mejor comprensión de la acción de la insulina, se analizaron la sensibilidad y las vías de señalización de la hormona. El análisis de la sensibilidad a la insulina, evaluada con un TTI y determinada como el AUC_{glucosa} generado a partir de la curva del TTI, no reveló ningún efecto del tratamiento con dapagliflozina ni en machos ni en hembras (Figura 15). Sin embargo, en los niveles de péptido C se observó una disminución para los ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina (Figura 16 A, B) indicando que el incremento de insulina durante el TTG no se atribuye a un incremento en la secreción de insulina por parte del páncreas. Consistente con estos resultados, el ensayo de secreción de la insulina realizado en islotes pancreáticos aislados de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con vehículo o con dapagliflozina mostró un menor índice de secreción de insulina en los islotes tratados con dapagliflozina (Figura 16C).

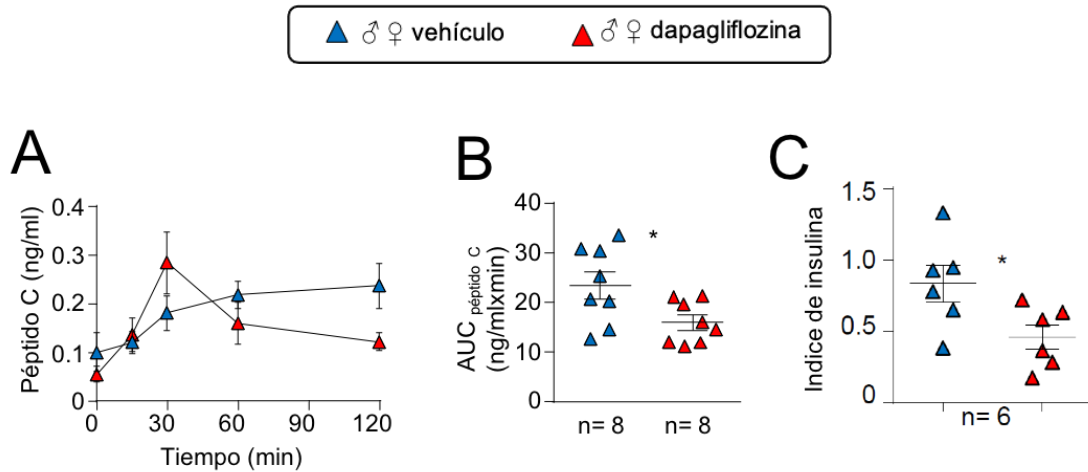


Figura 16. Niveles de péptido C en plasma durante el TTG de ratones *Apoe-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo. (A) Niveles plasmáticos de péptido C durante el TTG y (B) los correspondientes valores de AUC_{péptido C} en ratones *Apoe-/-Irs2+/-* tras 4h de ayuno. (C) Índice de secreción de la insulina en islotes pancreáticos de ratones *Apoe-/-Irs2+/-* tratados con vehículo o dapagliflozina obtenido del ensayo de secreción en la insulina mediante estimulación con glucosa. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (*p< 0.05).

Por otro lado, el estudio de la activación de la señalización de la insulina *ex vivo* en explantes de tejido adiposo de ratones *Irs2+/-* tratados con dapagliflozina mostró una disminución en la activación de la proteína AKT medida como la ratio de la forma fosforilada con respecto a la proteína total (phospho(p)AKT/AKT) (Figura 17). Estos resultados sugieren que la dapagliflozina no ejerce un efecto beneficioso sobre el metabolismo de carbohidratos en ratones *Apoe-/-Irs2+/-* e indican un efecto negativo sobre la señalización a través de la vía dependiente de AKT.

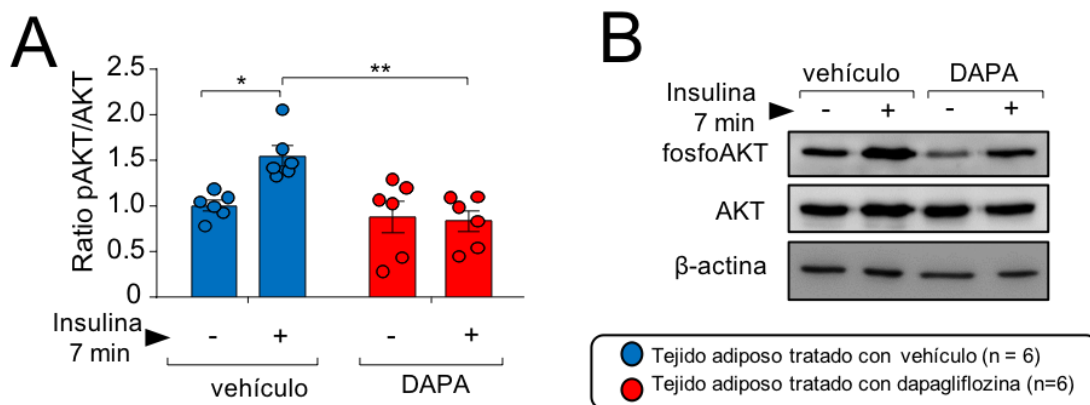


Figura 17. Efecto de la dapagliflozina en la vía de señalización de la insulina. (A) Cuantificación de los ratios de AKT1/2 fosforilada (pAKT1/2)/AKT1/2 en explantes de tejido adiposo estimulados con insulina y pretratados con vehículo o dapagliflozina 1µm. (B) Muestra representativa de los inmunoblots utilizados para la cuantificación. La β-actina se muestra como control de carga. Las formas proteicas fosforiladas se normalizaron con los niveles totales de proteína y se relativizaron respecto a la muestra no estimulada. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías seguido por la prueba *post hoc* de múltiples comparaciones de Tukey (*p < 0.05; ** p < 0.01).

Resultados

1.3. Efecto de la dapagliflozina en el tamaño o estabilidad de la placa aterosclerótica en ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}*

La determinación del tamaño de la lesión aterosclerótica *en face* de aortas enteras de ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* en las zonas del cayado aórtico (Figura 18 A, B) y de aorta torácica (Figura 18 D, E) no mostró diferencias entre el tratamiento con dapagliflozina y vehículo ni en machos ni en hembras.

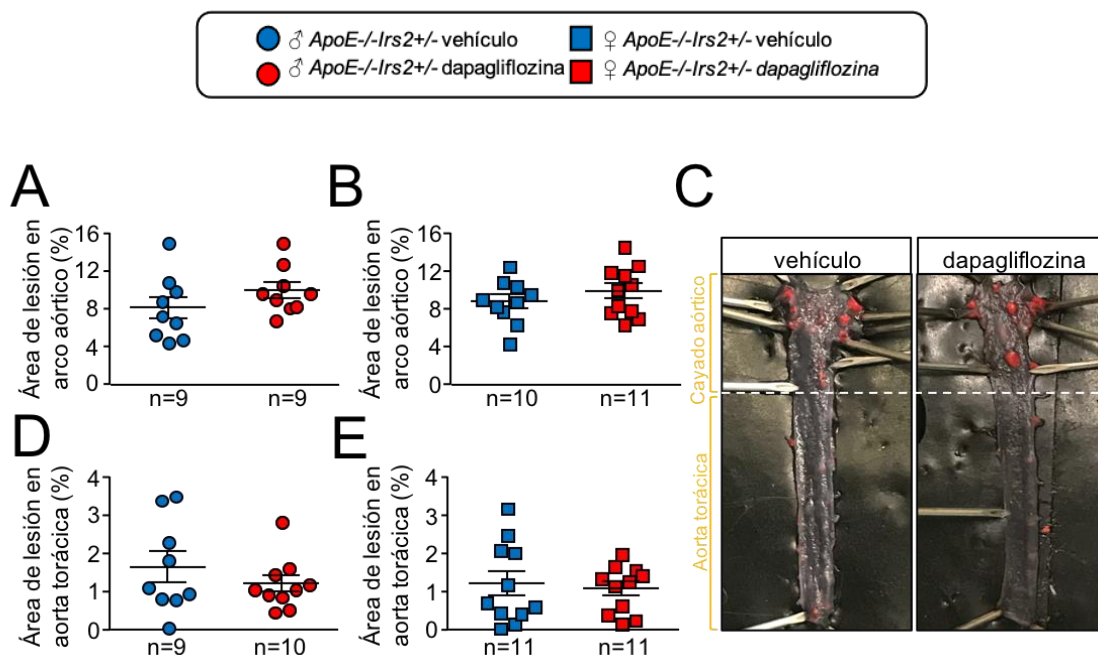


Figura 18. Análisis de la lesión aterosclerótica en aortas enteras de ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con dapagliflozina o vehículo. Análisis *en face* de la aterosclerosis en las aortas teñidas con Oil Red O en ambos grupos de ratones en la zona del arco aórtico (A, B) y de la aorta torácica (D, E) en ambos sexos. (C) Fotografías representativas de las aortas de ratones tratados con vehículo y dapagliflozina. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la t de Student's (A, B y D) y la prueba U de Mann-Whitney (E).

La determinación del desarrollo de la lesión aterosclerótica en cortes transversales de corazón analizados en zona de válvulas (Figura 19 A,B), aorta ascendente (Figura 19 C,D) y aorta (Figura 19 E,F) tampoco reveló diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento en ninguno de los dos sexos.

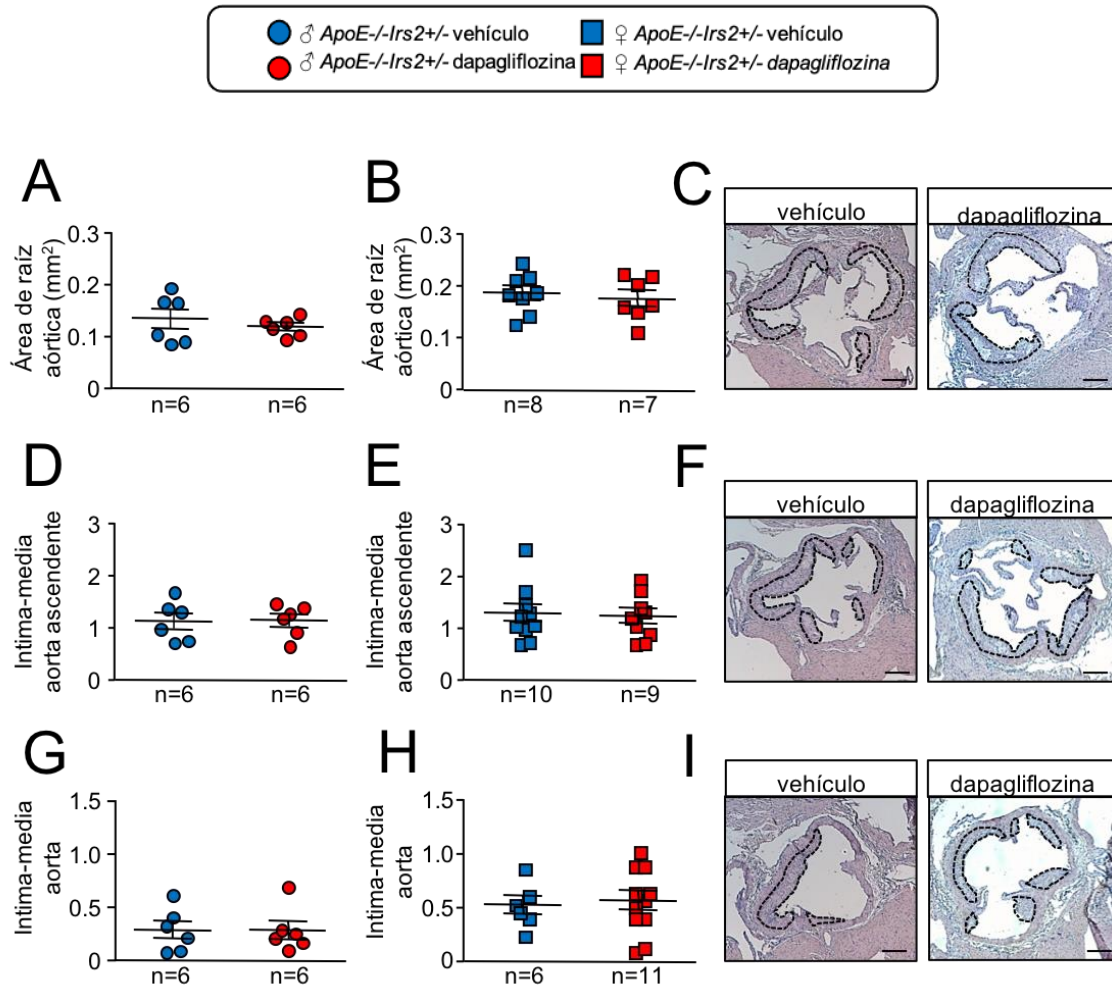


Figura 19. Determinación del tamaño de la lesión aterosclerótica en cortes transversales de aorta de ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina o vehículo. Tamaño de la lesión de ateroma en secciones transversales medida como área absoluta en las válvulas aórticas (A-C) y como índice intima-media en la aorta ascendente (D-F) y en la aorta (G-I) en ratones tratados con vehículo o con dapagliflozina. Imágenes representativas de los cortes transversales teñidos con hematoxilina-eosina en las válvulas (C), aorta ascendente (F) y aorta (I). Los límites de la lesión se indican mediante una línea discontinua. Escala: 200μm. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney (A-D y F-I) y t de Student's (E).

El análisis del contenido celular en la lesión de macrófagos (Figura 20 A-E) y de CMLVs (Figura 20 F-J), medidos como área absoluta en mm² o como área relativa en porcentaje no mostró diferencias entre los ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina y los tratados con vehículo en ninguno de los dos sexos. De manera similar, la determinación del contenido de linfocitos T (Figura 20 K-O), medido como número de células en la lesión y número de células por área de lesión, tampoco indicó un efecto de la dapagliflozina en ninguno de los dos sexos.

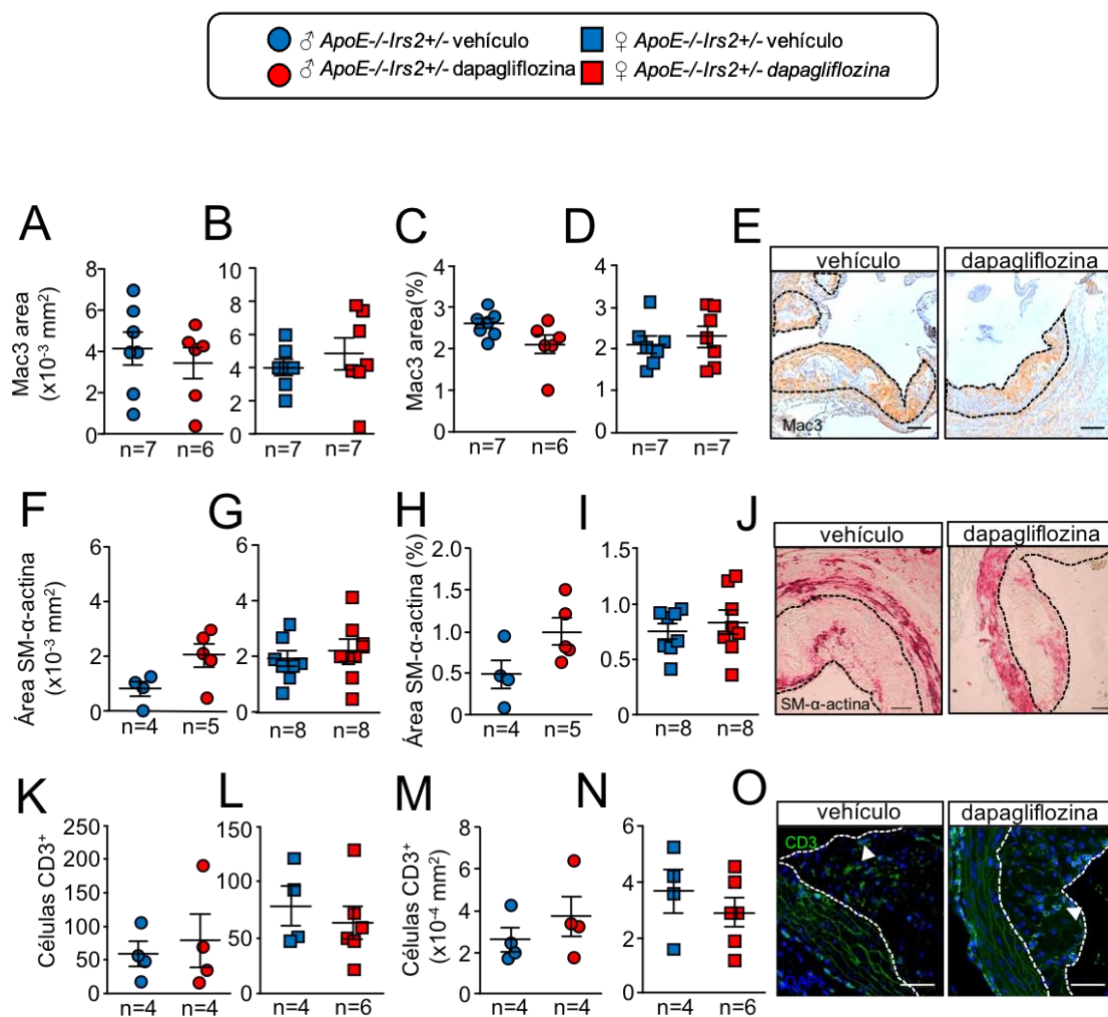


Figura 20. Análisis del efecto de la dapagliflozina sobre la composición celular de la placa de ateroma en secciones de aorta en ratones *ApoE-/-Irs2+/-*. Contenido de macrófagos (A-D) y de cMLVs (F-I) determinados como porcentaje de áreas Mac3⁺ y SM-α-actin⁺ relativas al área de lesión respectivamente y expresado como área absoluta (mm²). Escala: 100µm. Contenido de linfocitos T expresado como número de células CD3⁺ en la lesión (K, L) y como el número de células CD3⁺ relativo al área de lesión (M, N). Escala: 50µm. (E, J, O) Imágenes representativas tomadas con microscopio de las inmunotinciones. Los límites de la lesión aparecen representados mediante línea discontinua. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student's (G-I) y la prueba U de Mann-Whitney (A-D, F, H, K-N).

Seguidamente se determinaron parámetros relacionados con la estabilidad de la placa. El análisis del contenido de colágeno (Figura 21 A,B), área de núcleo necrótico (Figura 21 C,D) y el grosor de la capa fibrosa (Figura 21 F,G) determinados mediante la tinción tricrómica de Masson (Figura 21E) no mostró diferencias entre ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina y con vehículo. De manera similar, el análisis de la integridad de las fibras elásticas, medida como área relativa con respecto al área de la media, tampoco presentó diferencias entre tratamientos en ninguno de los dos sexos (Figura 21 H-I). El análisis del contenido de MMP9, una metaloproteinasa previamente relacionada con la estabilidad de la placa, medido como área relativa al área de lesión fue similar en ratones tratados con dapagliflozina y vehículo en ambos

sexos (Figura 21 M, N). Aunque, el análisis del contenido de MMP9, medido como área absoluta, indicó una disminución en las hembras *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratadas con dapagliflozina en comparación con las hembras vehículo sin cambios en los machos (Figura 21 K, L).

Estos resultados indican que la dapagliflozina en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}, alimentados con una dieta proaterogénica durante 8 semanas, no afecta al desarrollo de la aterosclerosis o a los parámetros de estabilidad de placa.

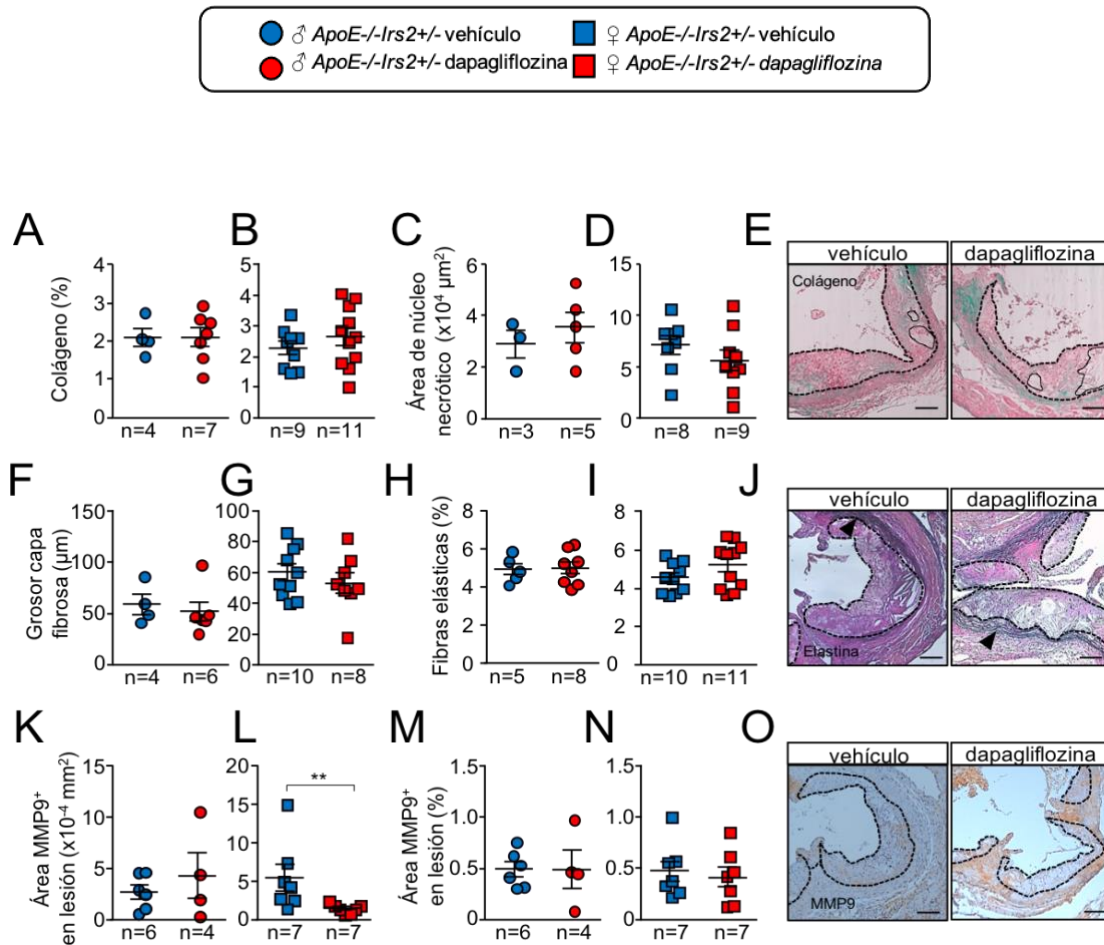


Figura 21. Efecto de la dapagliflozina en las características de la placa de ateroma en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. (A, B) Contenido en colágeno relativo al área de lesión expresado como porcentaje, (C, D) área de núcleo necrótico expresado en μm^2 y (F, G) grosor de la capa fibrosa expresado como μm determinados en la tinción tricrómica de Masson (E). (H, I) Contenido en fibras de elastina mediante la técnica de tinción de Verhoeff-Van Gieson (J) y expresado como porcentaje del área relativo al área de lesión. Contenido de MMP9 en cortes transversales de aorta expresado como (K, L) porcentaje del área relativa a la lesión y como (M, N) área absoluta (mm^2). Escala: 100 μm . (E, J, O) Se muestran imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas. Las líneas discontinuas limitan la íntima media, las líneas sólidas limitan el núcleo necrótico. Los datos se representan como puntos individuales con media \pm error y el análisis estadístico se realizó mediante test t-Student (B, D, G e I) y la prueba U de Mann-Whitney (K-N y A, C, F y H) (**p < 0.01).

Resultados

1.4. Efecto de la dapagliflozina en la inflamación sistémica en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}

Estudios previos indican un posible papel de las gliflozinas en la inflamación. Sin embargo, análisis de los niveles plasmáticos de las citoquinas circulantes en plasma de MCP1 y TNF α (Figura 22 A-D) fueron similares en los ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con vehículo y tratados con dapagliflozina, tanto en machos como en hembras.

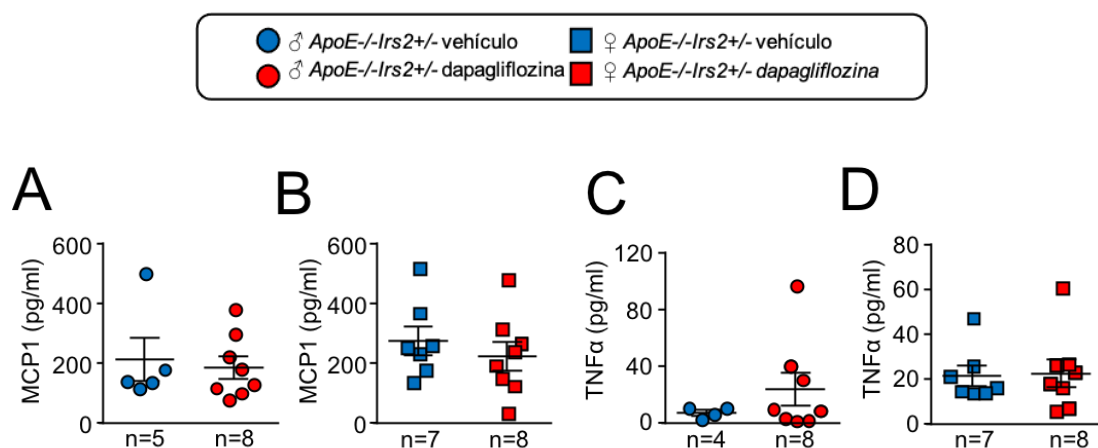


Figura 22. Efecto de la dapagliflozina en las citoquinas plasmáticas en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. Niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias (A, B) MCP1 y (C, D) TNF α . Los datos se representan como puntos individuales con media \pm error y el análisis estadístico se realizó mediante prueba U de Mann-Whitney.

El análisis de leucocitos circulantes en plasma mostró porcentajes similares de linfocitos, monocitos y neutrófilos entre ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con vehículo y tratados con dapagliflozina sin cambios entre los dos sexos (Figura 23 A, B). El análisis más detallado de los monocitos no detectó cambios entre los subtipos proinflamatorio Ly6C^{hi} y prorrresolutorio Ly6C^{lo} (Figura 23 C,D).

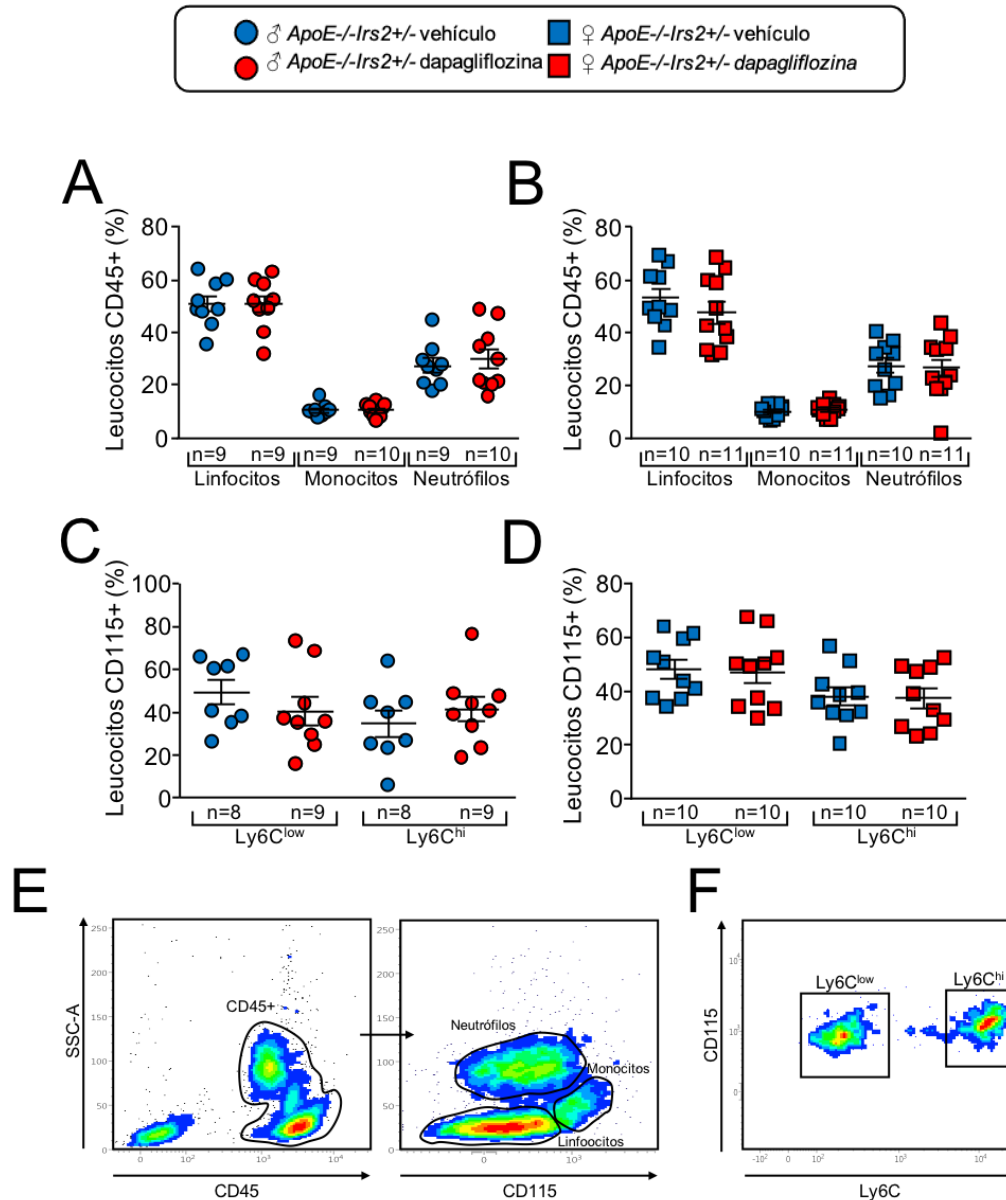


Figura 23. Caracterización de los leucocitos circulantes en sangre en ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con vehículo y con dapagliflozina. (A, B) Niveles circulantes de linfocitos, monocitos y neutrófilos en la población CD45+ expresados como porcentaje e identificados por morfología y el marcador de monocitos CD115. (C, D) Niveles circulantes de subtipos de monocitos expresados en porcentaje e identificados como CD45+CD115+Ly6C^{low} y CD45+CD115+Ly6C^{hi}. (E, F) Imágenes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de las poblaciones de monocitos en plasma. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student's.

De manera similar, el análisis de las poblaciones CD3+, CD4+ y CD8+ de linfocitos T no presentó diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los dos sexos (Figura 24 A-B, F-G, K-L). Tampoco se observaron cambios en las subpoblaciones de linfocitos T activadas CD3+CD69+, CD4+CD69+ y CD8+CD69+ (Figura 24 C-D, H-I, M-N).

Resultados

La cuantificación del subtipo de linfocitos T Treg CD4+CD25+Foxp3+ indicó una ausencia de efecto de la dapagliflozina en esta población leucocitaria en los ratones *ApoE-/-Irs2+/-* tanto en machos como en hembras (Figura 25 A, B).

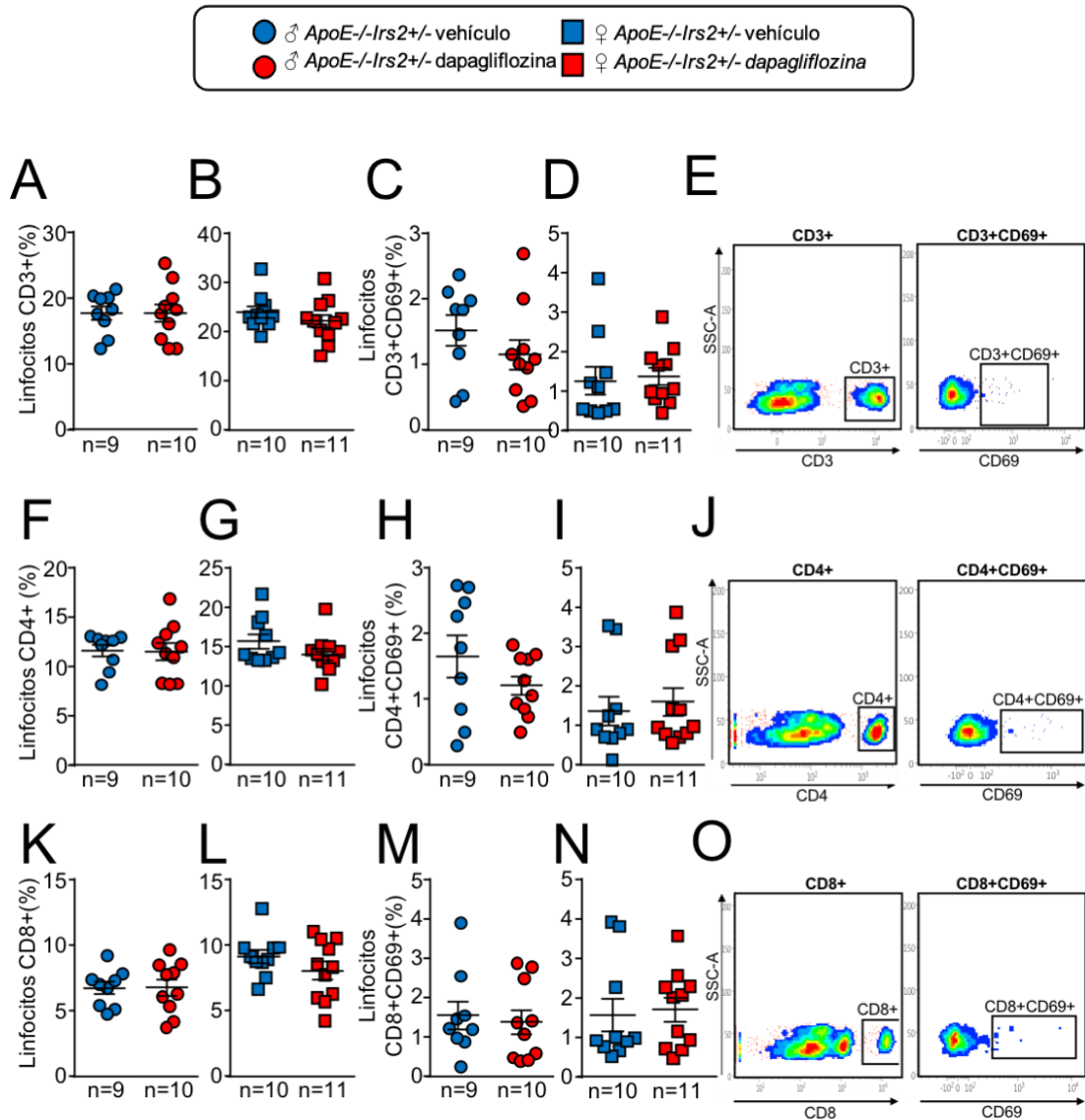


Figura 24. Análisis de los linfocitos circulantes en plasma de ratón *ApoE-/-Irs2+/-*. Porcentaje de linfocitos (A, B) CD3+, (F, G) CD4+ y (K, L) CD8+ y de linfocitos activados (C, D) CD3+CD69+, (H, I) CD4+CD69+, (M, N) CD8+CD69+ para ambos tratamientos y sexos. (E, J, O) Imágenes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de las poblaciones de linfocitos en plasma. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y los análisis estadísticos utilizados fueron el test t de Student's (B, D, G, H, I, K, L, N) y la prueba U de Mann-Whitney (A, C, F, M).

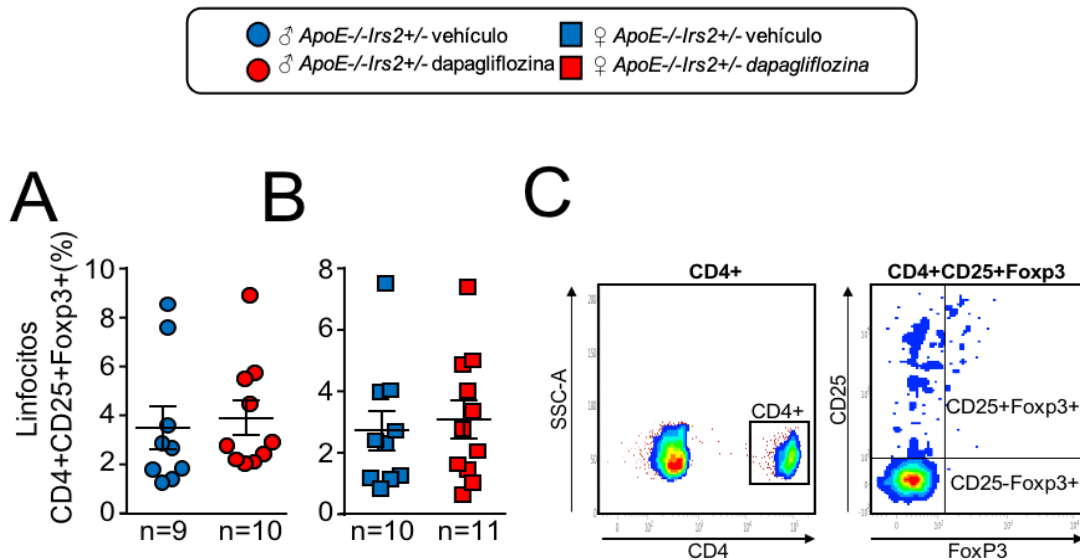


Figura 25. Análisis de los niveles circulantes de linfocitos Treg en plasma de ratón *ApoE-/Irs2+/-*. Niveles circulantes de la subpoblación de linfocitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ en ratones tratados con dapagliflozina y vehiculo en ratones *ApoE-/Irs2+/-* macho (A) y hembra (B). (C) Imágenes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de la subpoblación de linfocitos en plasma. Los datos se representan como puntos individuales con media ± error y los análisis estadísticos utilizados fueron el test t de Student's (A) y la prueba U de Mann-Whitney (B).

1.5. Efecto de la dapagliflozina en macrófagos de ratón *ApoE-/Irs2+/-*

Dado que en algunas investigaciones se ha mostrado que las gliflozinas pueden modular la polarización de los macrófagos a diferentes fenotipos se exploró el efecto de la dapagliflozina (DAPA) y de medio condicionado con plasma de ratones tratados con dapagliflozina (MC-DAPA) en las características inflamatorias de este tipo celular.

Con este fin se realizaron experimentos en macrófagos diferenciados de médula ósea de ratón *ApoE-/Irs2+/-* y se trataron con DAPA y MC-DAPA y con sus respectivos controles vehiculo y MC-vehiculo.

El análisis de expresión de citoquinas proinflamatorias reveló menores niveles de *Mcp1* en macrófagos tratados con DAPA (Figura 26A) comparado con macrófagos tratados con vehiculo, sin observarse cambios en la expresión de *Tnfa* o *Ii6* (Figura 26 B, C). El análisis de la expresión de las citoquinas en macrófagos tratados con medio condicionado no mostró cambios entre los macrófagos MC-DAPA y los MC-vehiculo (Figura 26 A-C). Interesantemente, los niveles de *Mcp1* fueron inferiores en los macrófagos MC-DAPA y los MC-vehiculo comparado con los vehiculos (Figura 26A).

Resultados

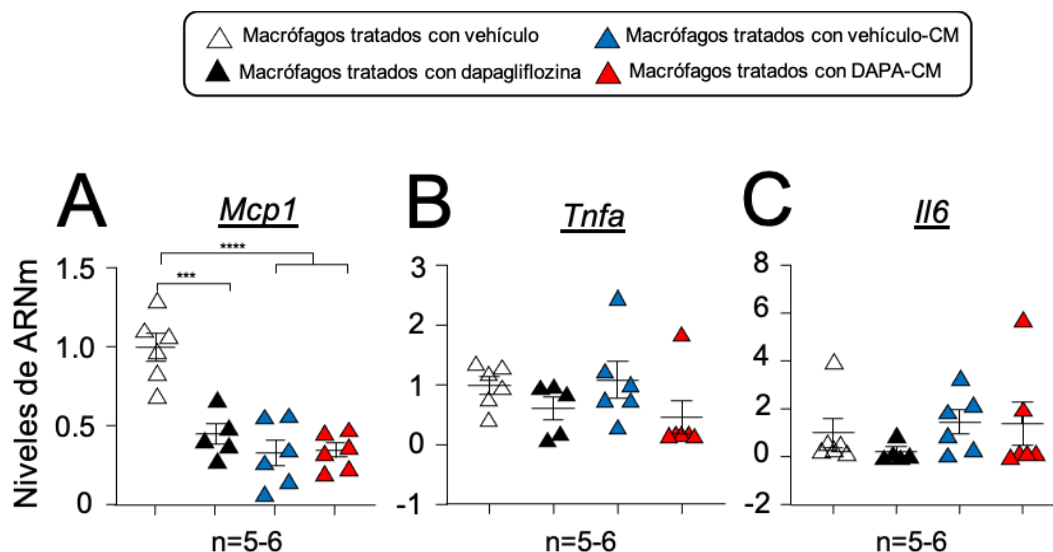


Figura 26. Niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos de ratón *Apoe-/-Irs2+/-*. Niveles de expresión de los ARNm de las citoquinas proinflamatorias (A) *Mcp1* (B) *TNF α* e (C) *Il6* en macrófagos de ratón *Apoe-/-Irs2+/-* tratados con vehículo, 1 μ M de dapagliflozina (DAPA) o con medio condicionado compuesto por un 10% de plasma proveniente de ratones tratados con vehículo (MC-vehículo) o con dapagliflozina (MC-DAPA). Los análisis estadísticos empleados fueron la ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey (a) y el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn's (b, c). (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$.

Los análisis de marcadores de superficie de macrófagos de subtipo de macrófago no mostraron diferencias significativas en el marcador de activación *Cd11c* (Figura 27A). Por el contrario, se observó una disminución en la expresión del marcador *Cd206* en los macrófagos tratados con dapagliflozina comparado con los macrófagos tratados con vehículo (Figura 27B). No se observaron cambios en los macrófagos tratados con medio condicionado, MC-vehículo y MC-DAPA.

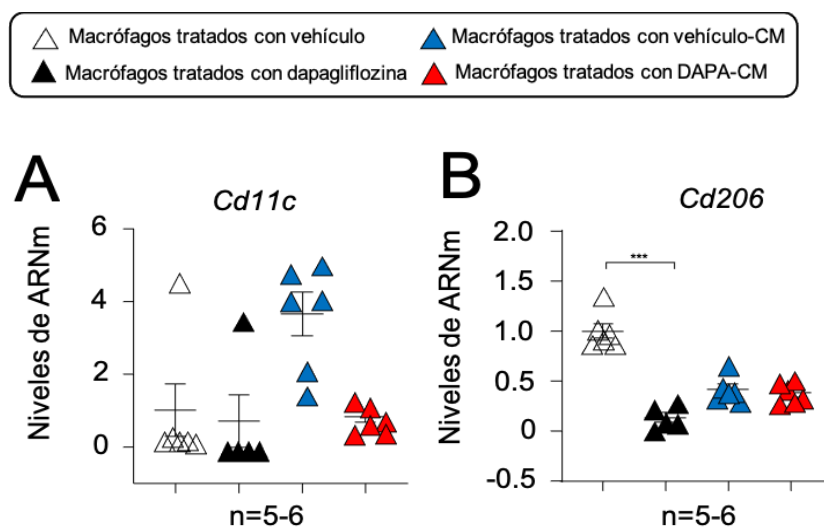


Figura 27. Expresión de *Cd11c* y *Cd206* en macrófagos de ratón *Apoe-/-Irs2+/-* tratados con dapagliflozina. Expresión de ARNm de (A) las integrinas *Cd11c* y (B) el receptor de la manosa *Cd206* en macrófagos de ratón *Apoe-/-*

Irs2^{+/-} tratados con vehículo, 1 μ M de dapagliflozina (DAPA) o con medio condicionado compuesto por un 10% de plasma proveniente de ratones tratados con vehículo (vehículoCM) o con dapagliflozina (DAPACM). El análisis estadístico empleado el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn's. (***) $p < 0.001$.

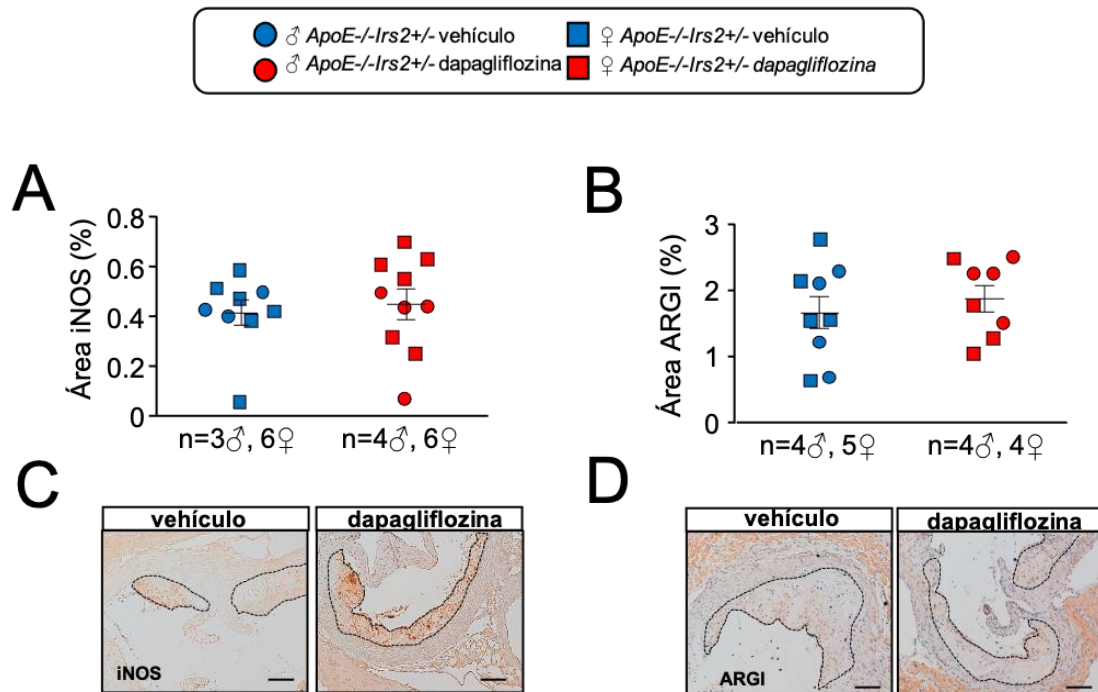


Figura 28. Efecto de la dapagliflozina sobre el contenido de iNOS y Arg1 ratón *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. Contenido en la lesión de (A) iNOS y (B) Arg1 en cortes transversales de aorta de ambos grupos de tratamiento y sexos. (C, D) Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de iNOS y ARG1. Escala: 100 μ m. Los datos se representan como puntos individuales con media \pm error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney (A, B).

Consistente con los resultados obtenidos en macrófagos con media condicionado, el contenido de los marcadores iNOS y ARG1 que se asocian con macrófagos proinflamatorios y anti-inflamatorios respectivamente, fueron similares en las lesiones de ratones *ApoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} tratados con vehículo y dapagliflozina (Figura 28 A, B).

2. Estudio de las alteraciones inmunes en un modelo murino de esteatosis

Con la finalidad de inducir EHGNA con características similares a las observadas en humanos, se utilizó una dieta esteatogénica consistente en 41.5% azúcar, 21% grasa y 1.25% colesterol (Dieta EHNA). Ratones *WT* de 8 semanas de edad se alimentaron con una dieta control (DC) o con una dieta alta en grasa y alta en colesterol (DEHNA) durante 16 semanas. Posteriormente, se analizó el metabolismo, la inflamación y el desarrollo de la EHGNA en estos ratones.

Resultados

2.1. Estudio del metabolismo en ratones *WT* sometidos a una dieta esteatogénica

2.1.1. Caracterización metabólica en ratones *WT* sometidos a dieta esteatogénica

El análisis del peso corporal de los animales tras 16 semanas reveló un incremento en ambos grupos comparado con sus pesos iniciales, así también se observó que los animales alimentados con DEHNA tras 16 semanas presentaban un peso corporal menor respecto a los animales con DC (Figura 29A). No se observaron diferencias en los niveles de glucosa basal en estado de ayuno entre ambos grupos (Figura 29B); sin embargo, el peso del hígado en ratones alimentados con DEHNA era significativamente mayor respecto a los animales con DC (Figura 29C).

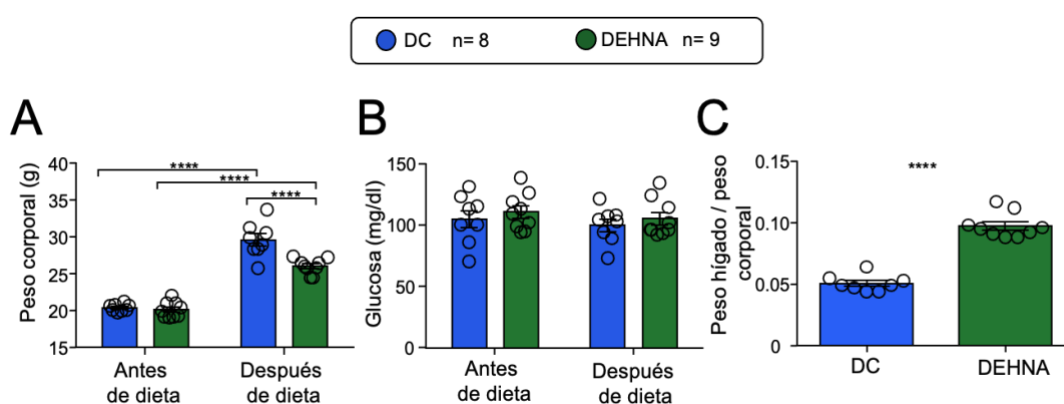


Figura 29. Peso corporal, niveles basales de glucosa en estado de ayuno y peso del hígado de ratones *WT* alimentados con DC o con DEHNA. (A) Peso corporal (g), (B) glucosa basal en estado de ayuno de ambos grupos de ratones y (C) peso del hígado relativo al peso total. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba *post hoc* de Tukey (A y B) y la t de student's (C) (**** $p < 0.0001$).

2.1.2. Caracterización del metabolismo de carbohidratos y lípidos en ratones *WT* sometidos a una dieta esteatogénica

El análisis de la tolerancia a la glucosa, medido con el parámetro del área bajo de la curva ($AUC_{glucosa}$) durante el TTG, mostró valores similares para los dos grupos de ratones alimentados con DC y DEHNA (Figura 30 A, B). Los niveles de insulina durante este test, medido como $AUC_{insulina}$, fueron similares en ambos grupos de ratones (Figura 30 C, D). Sin embargo, el análisis de los niveles de péptido C, medidos con el $AUC_{peptidoC}$ mostró una disminución lo que sugiere una menor secreción por parte del páncreas (Figura 30 E, F). Por otro lado, el test de sensibilidad a la insulina, medido como $AUC_{glucosa}$ tras la inyección de la insulina mostró niveles inferiores de glucosa indicado mayor sensibilidad a la hormona (Figura 30 G, H). Dado que los niveles de péptido C fueron inferiores en los ratones con DEHNA, la mayor sensibilidad a la insulina observada podría estar relacionada con un fallo en los mecanismos de degradación de la insulina o al peso inferior en los ratones DEHNA.

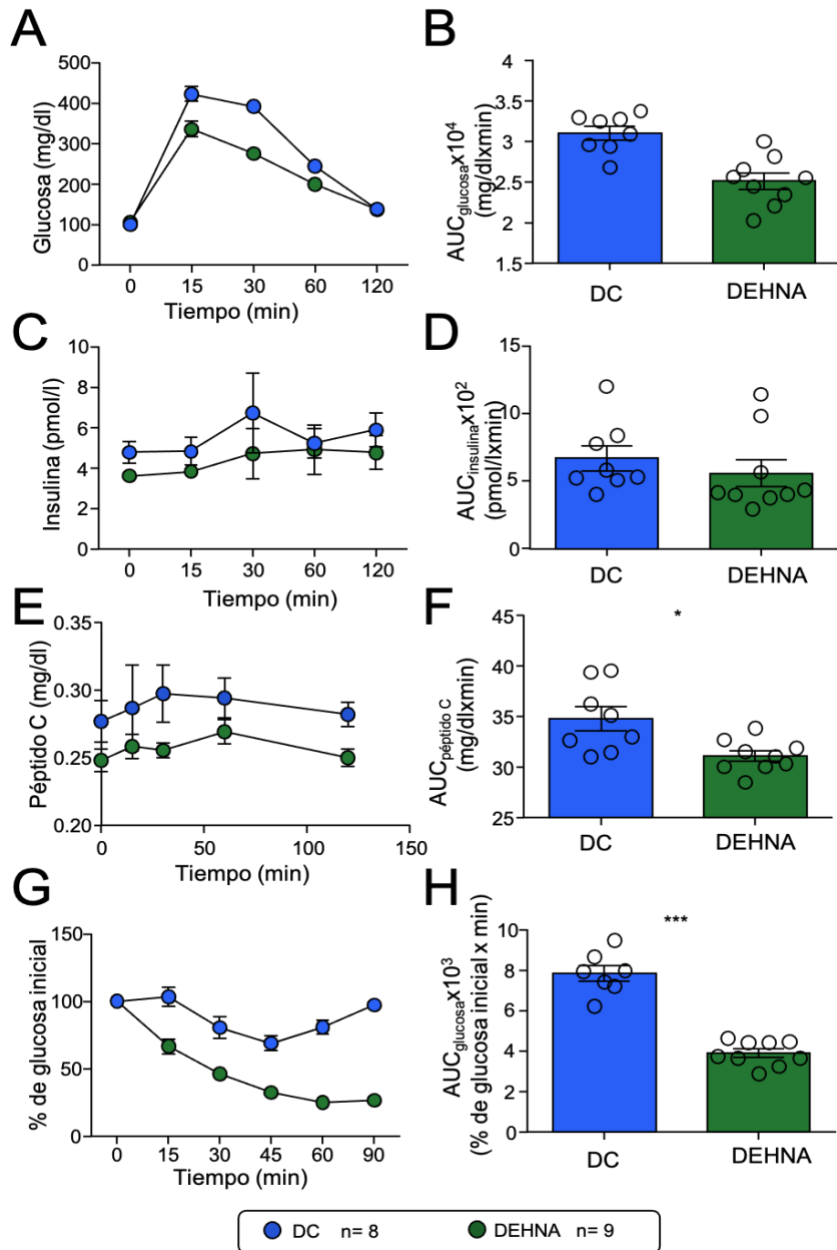


Figura 30. Caracterización metabólica durante el TTG y el TTI de ratones *WT* alimentados con dieta DC o DEHNA.

(A) Niveles de glucosa en los diferentes tiempos del TTG y (B) área bajo la curva (AUC_{glucosa}) calculada a partir de la curva de glucosa durante la prueba. (C) Niveles plasmáticos de insulina liberados por el páncreas tras ser estimulado por la administración de glucosa a los diferentes tiempos del TTG y (D) valores de AUC_{insulina} calculada a partir de la curva de secreción de insulina. (E) Niveles plasmáticos de péptido C durante el TTG y los correspondientes (F) valores de AUC_{péptido C} tras 4h de ayuno. (G) Niveles de glucosa en plasma en porcentaje relativo a los niveles de glucosa iniciales durante el TTI y (H) valores de AUC_{glucosa} tras 4h de ayuno. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y los análisis estadísticos empleados fueron la prueba t de Student's (B, D y F) y U de Mann-Whitney (H) (*p< 0.05).

Resultados

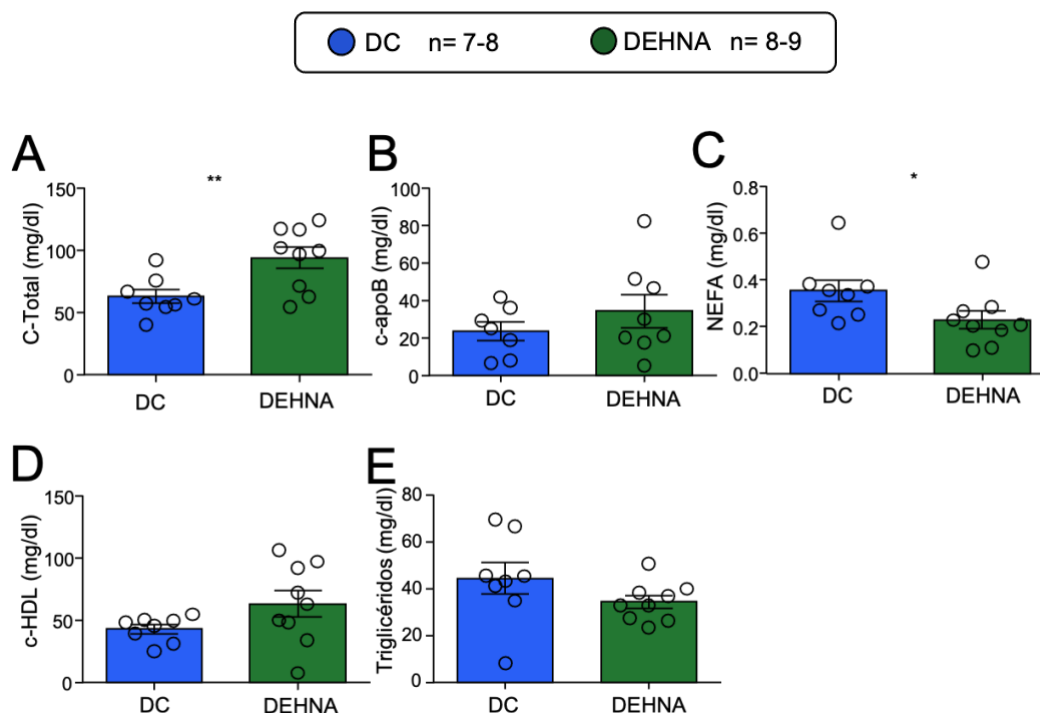


Figura 31. Niveles lipídicos en plasma de ratones WT alimentados con DC o DEHNA durante 16 semanas. Niveles de colesterol total (A), colesterol apoB (B), NEFA (C), colesterol HDL (D) y triglicéridos (E) en ambos grupos de dieta. Los datos se representan como puntos individuales con media ± error y los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student's (A, D-E) y el test U de Mann-Whitney (B, C) (*p<0.05; **p< 0.01).

El análisis de los niveles de colesterol total en plasma mostraron un aumento en los ratones alimentados con DEHNA (Figura 31A). Los niveles plasmáticos de colesterol apoB, colesterol HDL o de triacilglicéridos, sin embargo, fueron similares en ambos grupos de ratones (Figura 31 B, D, E). Asimismo, los niveles de NEFA en plasma revelaron una disminución en los animales alimentados con DEHNA comparado con los alimentados con DC (Figura 31C) consistente con un menor peso corporal.

2.2. Estudio de la fibrosis y de la inflamación sistémica en ratones WT sometidos a una dieta esteatogénica

2.2.1. Análisis de los parámetros inflamatorios en hígado

Seguidamente se estudió la inflamación y el daño hepático inducidos por la dieta EHNA.

El análisis del tejido hepático, en cortes histológicos para determinar el grado de esteatosis demostró la puntuación NAS una mayor puntuación en los parámetros de esteatosis, inflamación lobular y degeneración balonzante y consecuentemente una mayor puntuación NAS (del inglés *NAFLD Activity Score*) en los ratones alimentados con la DEHNA (Figura 32 A-D). Consistente con un estado más avanzado de esteatosis en los ratones alimentados con DEHNA, éstos

mostraron un aumento en fibrosis, medido como porcentaje de contenido de colágeno comparado con ratones alimentados con DC (Figura 32 E).

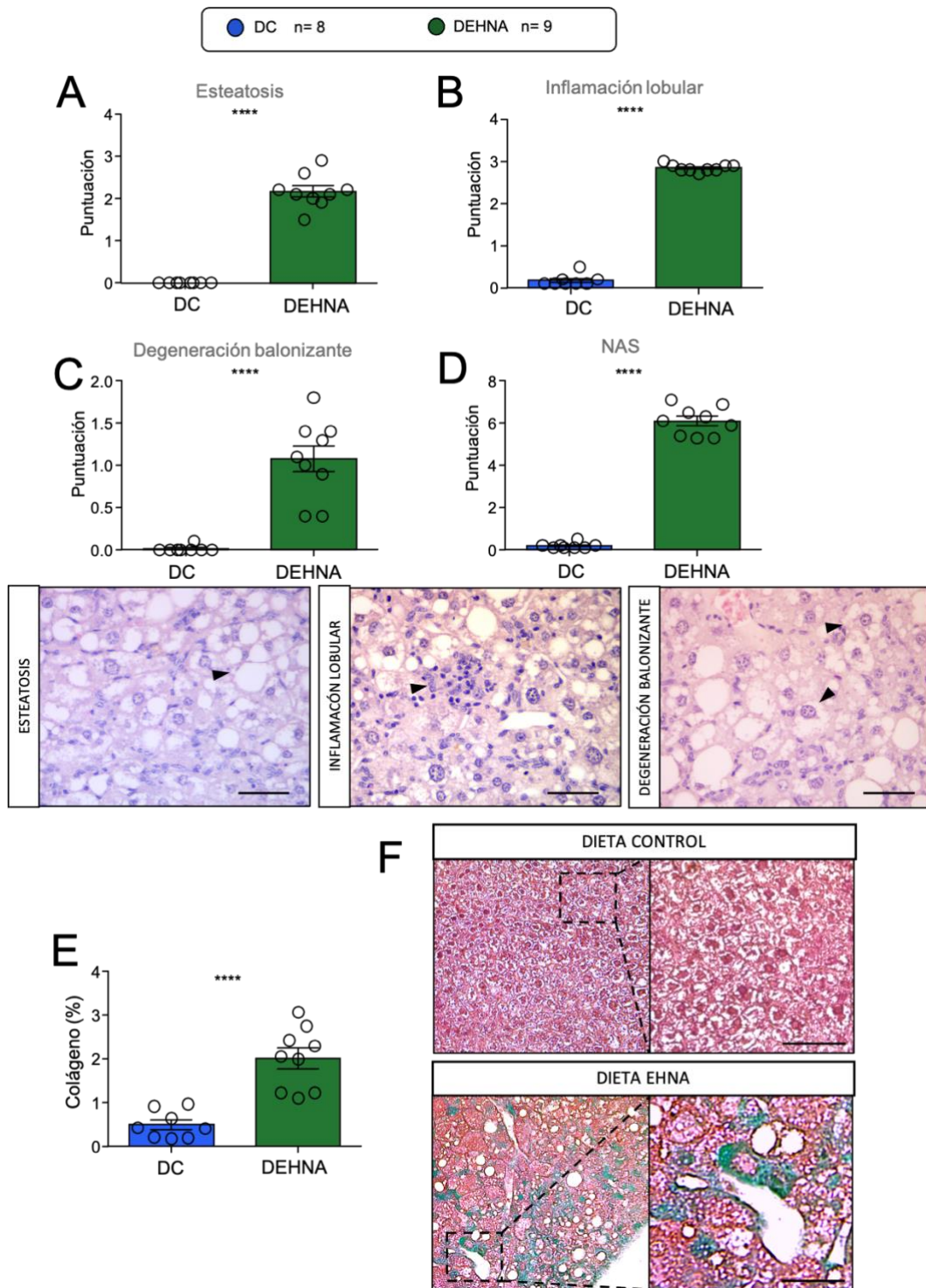


Figura 32. Caracterización de la EHNA y fibrosis en ratones *WT* alimentados con DEHNA durante 16 semanas. Análisis de (A) la esteatosis, (B) inflamación lobular, (C) degeneración balonzante, (D) NAS y (E) fibrosis medida como porcentaje de colágeno (%) respecto al área total. Escala: 50µm; 100µm y 50µm en las ampliaciones en F. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student's (E) y el test U de Mann-Whitney (A-D) (****p< 0.0001).

Resultados

El análisis del contenido en triglicéridos en hígado reveló un aumento en ratones alimentados con la dieta EHNA (Figura 33A) sugiriendo una mayor esteatosis. Y, consistente con un estado más avanzado de esteatosis, los ratones alimentados con EHNA mostraron una mayor infiltración de linfocitos T CD3+ (Figura 33B) indicando mayor inflamación hepática.

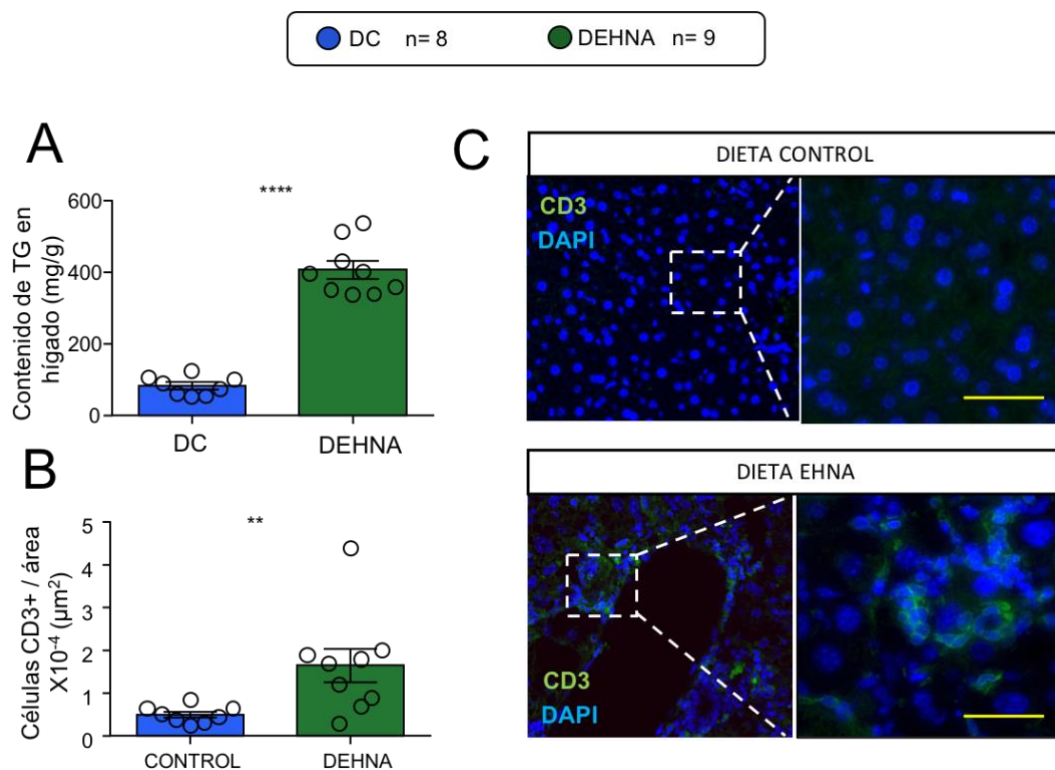


Figura 33. Contenido hepático de células inmunes CD3+ y de triglicéridos hepáticos en ratones WT alimentados con DEHNA durante 16 semanas.(A) Análisis del contenido de triglicéridos en el tejido hepático en ratones alimentados con DC y DEHNA durante 16 semanas y (B) Contenido en linfocitos T CD3+ relativo al área total (μm^2) e imágenes representativas de ambas dietas (C). Escala: 100 μm y 50 μm en ampliaciones. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student's (A) y el test U de Mann-Whitney (B) (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

La caracterización del fenotipo de los macrófagos del tejido hepáticos mostró un incremento en el fenotipo proinflamatorio M1 F4/80+CD11c+ (Figura 34B), sin diferencias para el fenotipo M2 F4/80+CD206+ (Figura 34C) en ratones alimentados con DEHNA comparado con ratones DC.

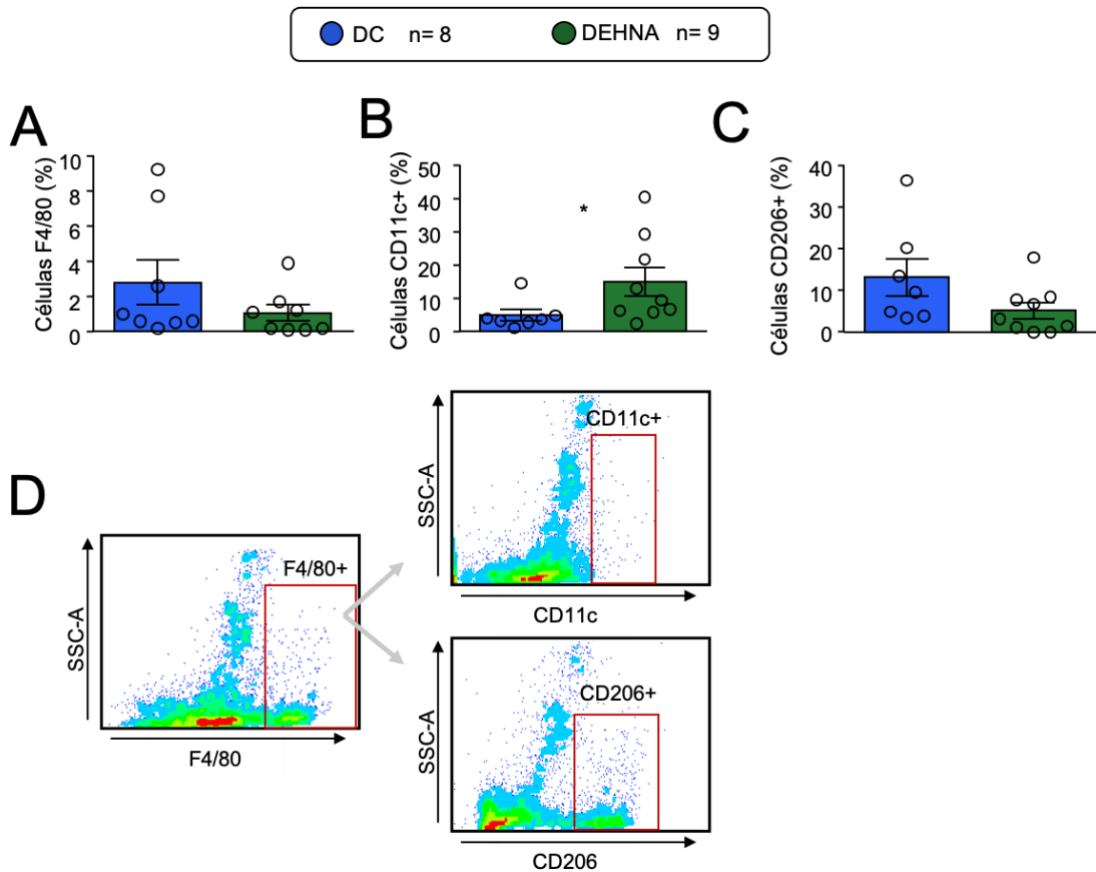


Figura 34. Análisis de los macrófagos del tejido hepático en ratones *WT* alimentados con DEHNA. Porcentaje de macrófagos F4/80+ (A), M1 F4/80+CD11c+ (en % respecto al total de F4/80+) (B) y M2 F4/80+CD206+ (en % respecto al total de F4/80+) (C) en ambos grupos de ratones. (D) Imágenes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de las poblaciones de linfocitos en tejido hepático. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Estos resultados indican que la dieta utilizada para inducir esteatosis va acompañada de una inflamación tisular hepática sugiriendo que cursa con síntomas de progresión a EHNA.

2.2.2. Análisis de la inflamación sistémica mediante el análisis de poblaciones leucocitarias

Con la finalidad de caracterizar la inflamación sistémica se procedió al análisis de las poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo. Este análisis permitió un aumento de la población de monocitos Ly6C^{lo}, así como un descenso en el subtipo de monocitos Ly6C^{hi} en ratones sometidos a DEHNA durante 16 semanas (Figura 35B).

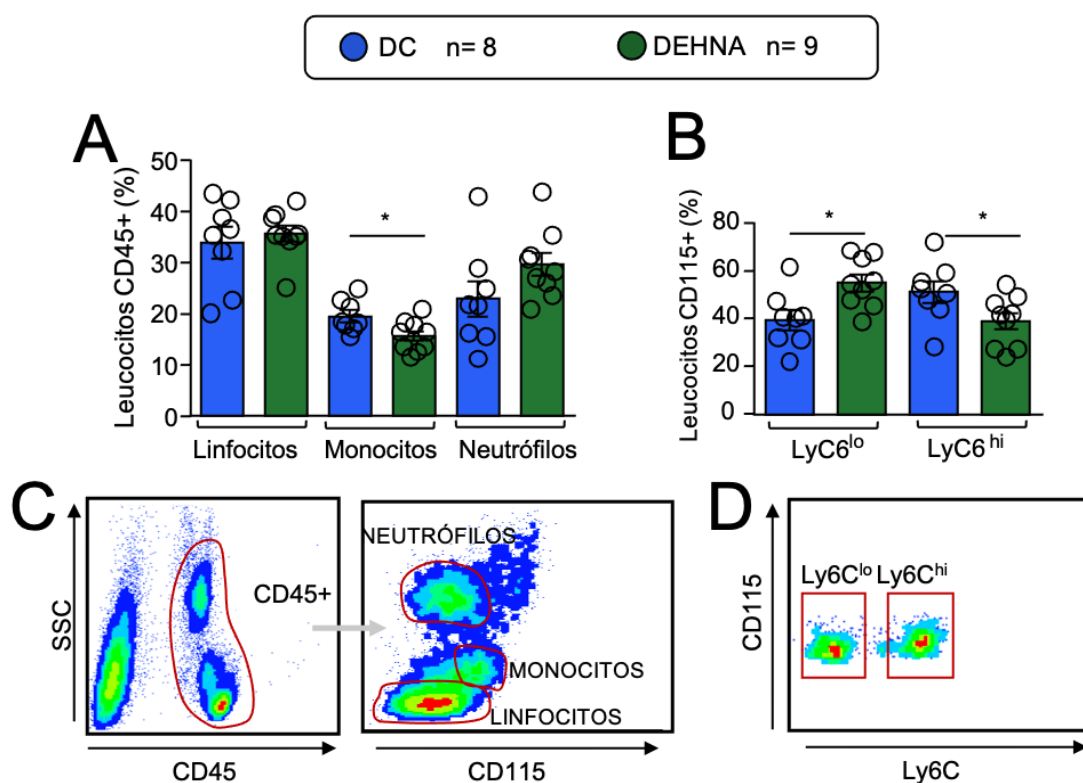


Figura 35. Caracterización de los leucocitos circulantes en sangre en ratones *WT* sometidos a DEHNA durante 16 semanas. (A) Niveles circulantes de linfocitos, monocitos y neutr6filos en la poblaci6n CD45+ expresados como porcentaje e identificados por morfologí a y el marcador de monocitos CD115. (B) Niveles circulantes de subtipos de monocitos expresados en porcentaje e identificados como CD45+CD115+Ly6C^{low} y CD45+CD115+Ly6C^{hi}. (C, D) Imá genes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de las poblaciones de monocitos en plasma. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student's.

Los niveles de neutr6filos identificados como Ly6G+ no mostraron diferencias entre grupos (Figura 36A). Tampoco se encontraron diferencias en el análisis de linfocitos T totales CD3+ ni en los activados CD3+CD69+ (Figura 36 C, D). Sin embargo, se observó una disminuci6n de los linfocitos T CD4+, sin cambios en los activados CD4+CD69+ (Figura 36 F, G). por otro lado, se observó un aumento en la poblaci6n de linfocitos T CD8+, mientras la examinaci6n del subtipo de linfocitos T activados CD8+CD69+ (Figura 36 I, J) mostr6 una disminuci6n en los ratones alimentados con DEHNA. El porcentaje circulante de linfocitos B marcados como CD19+ mostraron un incremento en ratones alimentados con DEHNA (Figura 36L). El análisis de las células NKT y NK identificados como CD3+NK1.1+ y NK1.1+ respectivamente no mostr6 diferencias entre ambos tipos de dieta (Figura 36 N, O).

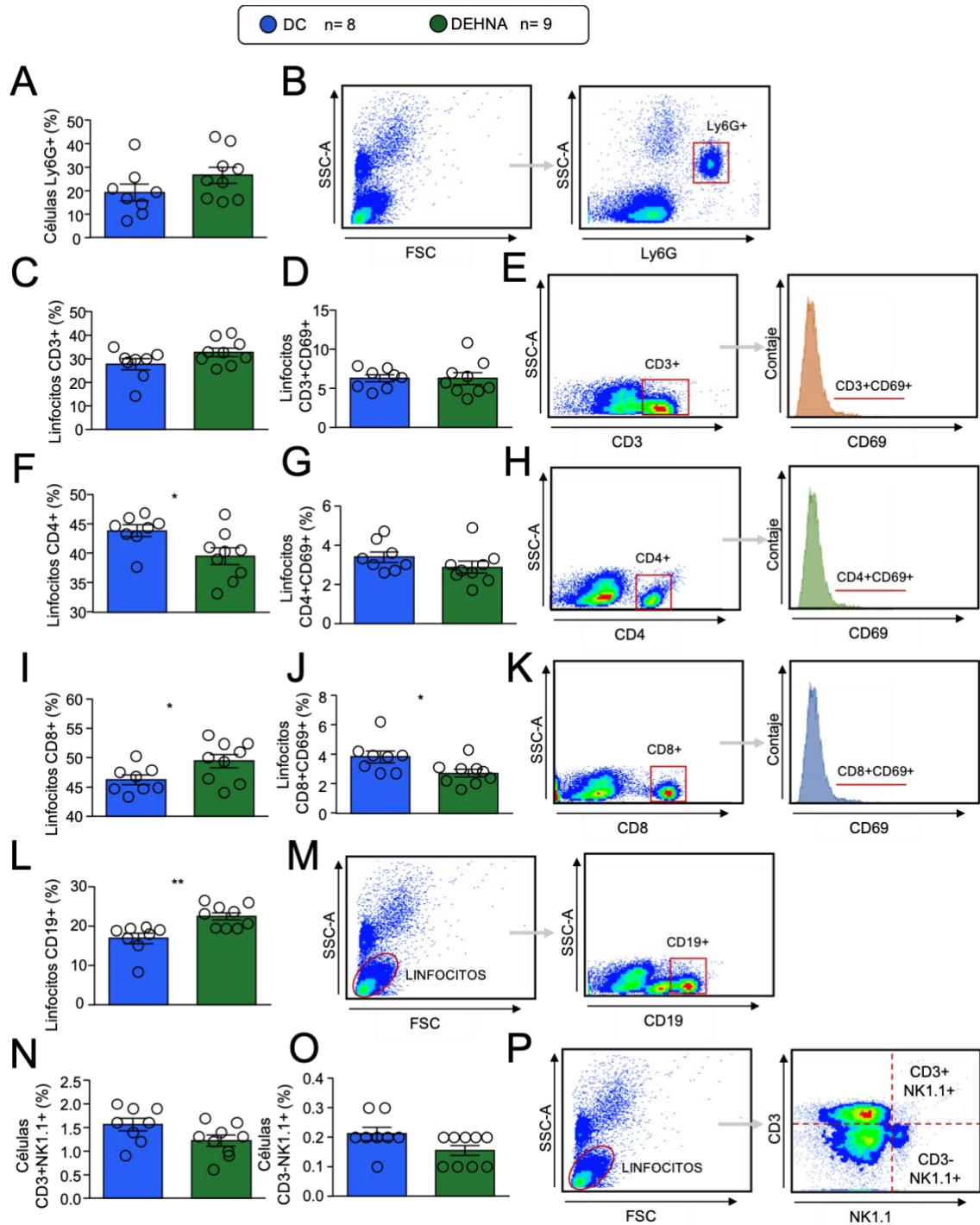


Figura 36. Análisis de los linfocitos circulantes en ratones WT alimentados con dieta DEHNA durante 16 semanas. Niveles circulantes células Ly6G+ (A) y de linfocitos CD3+ (C), CD4+ (F) y CD8+(I) y de sus poblaciones activadas CD3+CD69+ (D), CD4+CD69+ (G) y CD8+CD69+ (J) expresados como porcentaje en ambos grupos de ratones. Porcentaje de linfocitos B CD19+ (L) y de células NKT (N) y NK(O). (B, E, H, K, M, P) Imágenes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de las poblaciones de linfocitos en plasma. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student's (A, D, I, N) y la prueba U de Mann-Whitney (C, F, G, J, L, O).

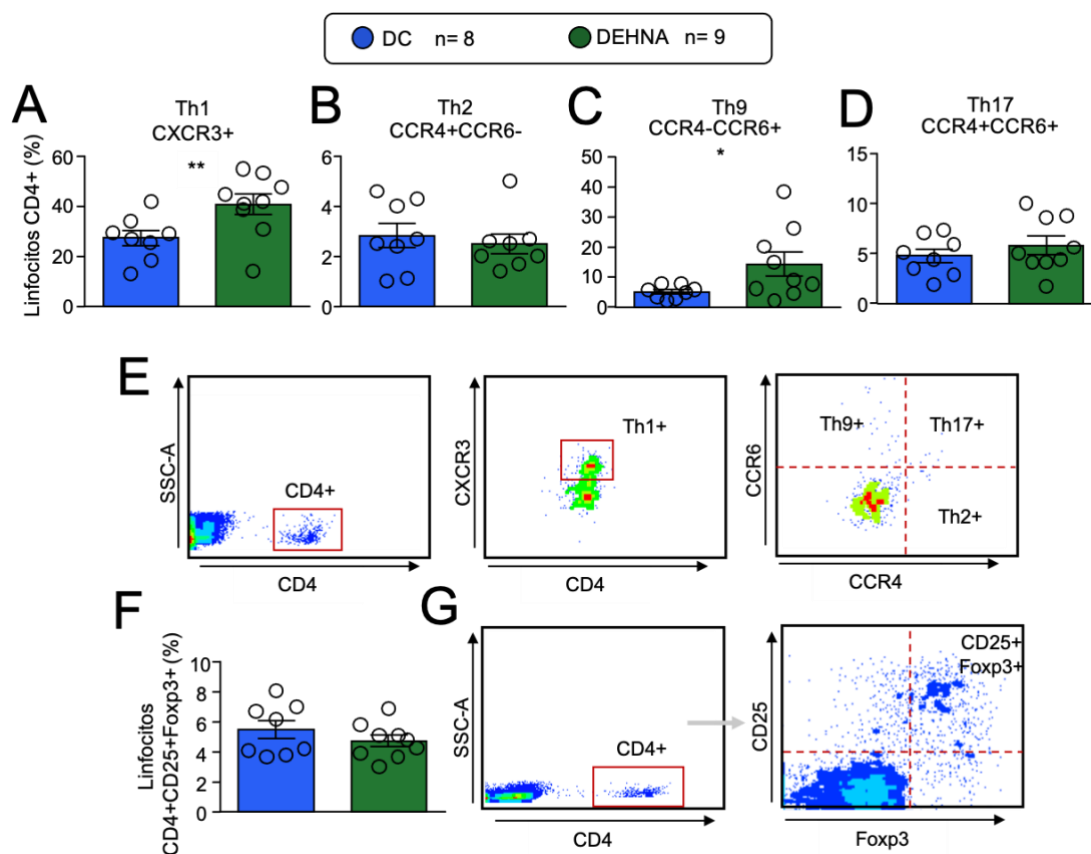


Figura 37. Análisis de subtipos de linfocitos T CD4+ en ratones WT alimentados con dieta DEHNA y DC durante 16 semanas. Niveles plasmáticos de los linfocitos Th1 CXCR3+ (A), Th2 CCR4+CCR6- (B), Th9 CCR4-CCR6+ (C), Th17 CCR4+CCR6+ (D) y de los linfocitos Treg CD25+Foxp3+ (F). (E y G) Imágenes representativas del análisis de citometría empleado para el acotamiento de las poblaciones de linfocitos Th en plasma. Los datos se representan como puntos individuales con media±error y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student's (A, C, D, F) y la prueba U de Mann-Whitney (B).

La examinación de subtipos de linfocitos T CD4+ reveló un aumento en los linfocitos Th1 CXCR3+ y Th9 CCR4-CCR6+ (Figura 37 A, C) en ratones alimentados con DEHNA, sin cambios en los subtipos Th2 CCR4+CCR6-, Th17 CCR4+CCR6+ y Treg CD4+CD25+Foxp3+ (Figura 37 B, D, F).

Nuestros datos en conjunto indican una mayor inflamación sistémica con aumento en linfocitos CD8+ citotóxicos y linfocitos B CD19+ y se corresponde con un mayor infiltrado hepático de macrófagos proinflamatorios.

2.3. Estudio de la expresión génica en ratones WT con una dieta esteatogénica

Para una mayor caracterización del efecto de la dieta EHNA, se determinó la expresión de genes relacionados con la progresión de transición EGHNA a EHNA. La examinación de los genes relacionados con la activación de células estrelladas hepáticas, *Col1a1* y *Acta2* (Figura 38

A, B), mostraron niveles similares en ambos grupos, así como también los niveles de expresión génica de la metaloproteasa *Mmp9* (Figura 38C). Sin embargo, los niveles de expresión de genes relacionados con la fibrosis, *Tgfb1* y *Timp1* fueron mayores en los ratones alimentados durante 16 semanas con DEHNA comparado con los ratones alimentados con DC (Figura 38 D-E).

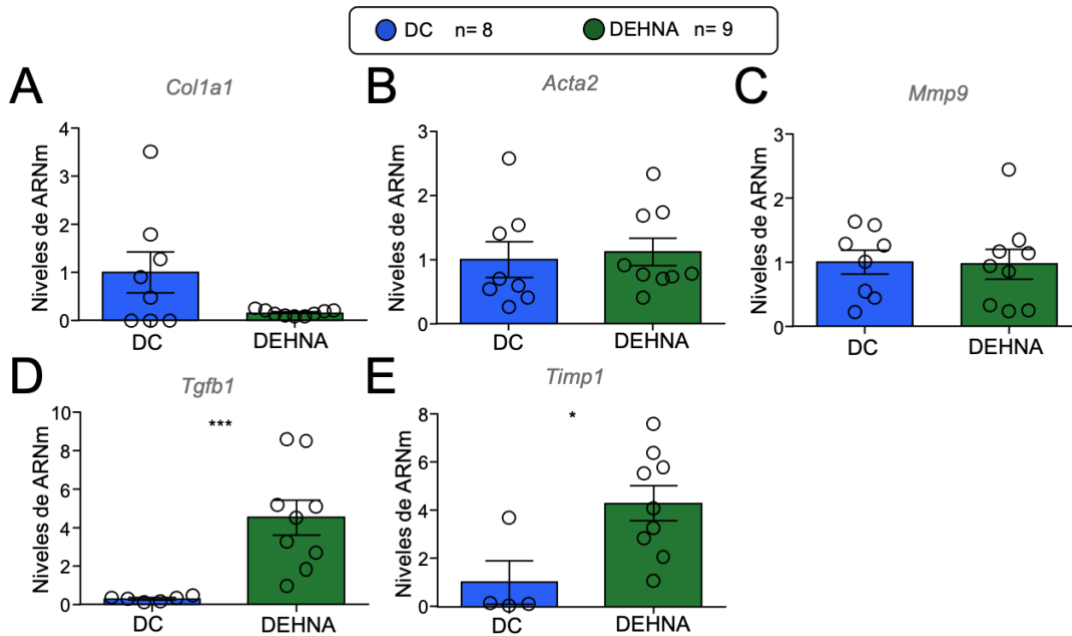


Figura 38. Expresión de marcadores de células estrelladas hepáticas y de fibrosis en ratones alimentados con DEHNA. Niveles de ARNm de *Col1a1* (A), *Acta2* (B), *Mmp9* (C), *Tgfb1* (D) y *Timp1* (E). Los niveles de ARNm se normalizaron con el gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron a los niveles de mRNA de ratones control *WT* alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas estadísticas t de Student's (A-C) y el test U de Mann-Whitney (D y E) (*p< 0.05; ***p<0.001).

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de marcadores de diferenciación de células inmunes en hígado, *Tbet* como marcador de diferenciación de linfocitos Th1, *Gata3* de linfocitos Th2, *Rorc* de linfocitos Th17, *Foxp3* de células T reguladoras y *Zbtb16* (*Plzf*) de células NKT. La expresión de *Tbet* y *Gata3* mostró niveles similares en ratones alimentados con ambos tipos de dieta (Figura 39 A, B) mientras que en los ratones alimentados con DEHNA los niveles de mRNA de *Foxp3* (Figura 39D), fueron superiores y los de *Rorc* y *Zbtb16* inferiores (Figura 39 C, E) comparado con los ratones alimentados con DC.

Resultados

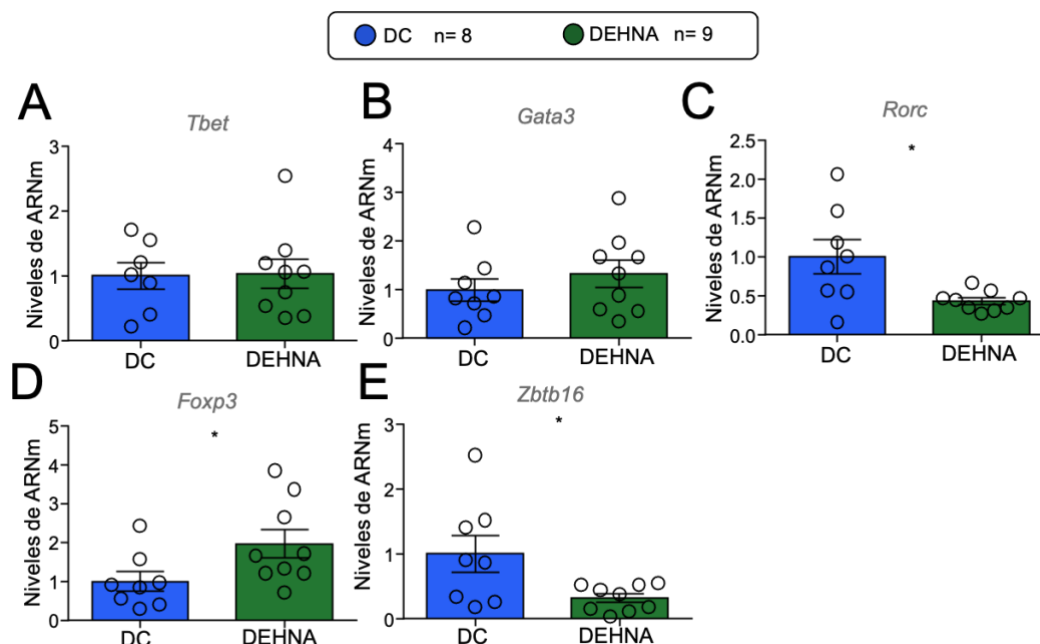


Figura 39. Expresión de factores transcripcionales determinantes de células inmunes en hígado de ratón alimentado con DEHNA y DC durante 16 semanas. Niveles de ARNm de *Tbet* (A), *Gata3* (B), *Rorc* (C), *Foxp3* (D), y *Zbtb16* (E). Los niveles de ARNm se normalizaron respecto al gen endógeno *Ciclofilina* y se relativizaron a los niveles de mRNA de los ratones control WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas estadísticas t de Student's (B, C, D y E) y el test U de Mann-Whitney (A) (*p < 0.05).

Seguidamente se procedió al análisis de genes del metabolismo hepático para determinar el grado de daño hepático. El análisis de la expresión génica en hígado mostró una disminución en la expresión de los genes *Abca1* y *Lxr*, asociados con la internalización de colesterol en hígado, en los ratones que habían sido alimentados con DEHNA (Figura 40 A, B), sin observarse diferencias significativas en la expresión de los genes *Fxr*, *Abcg5* y *Cyp7a1* asociados con la secreción de colesterol a heces y producción de ácidos biliares (Figura 40 C-E).

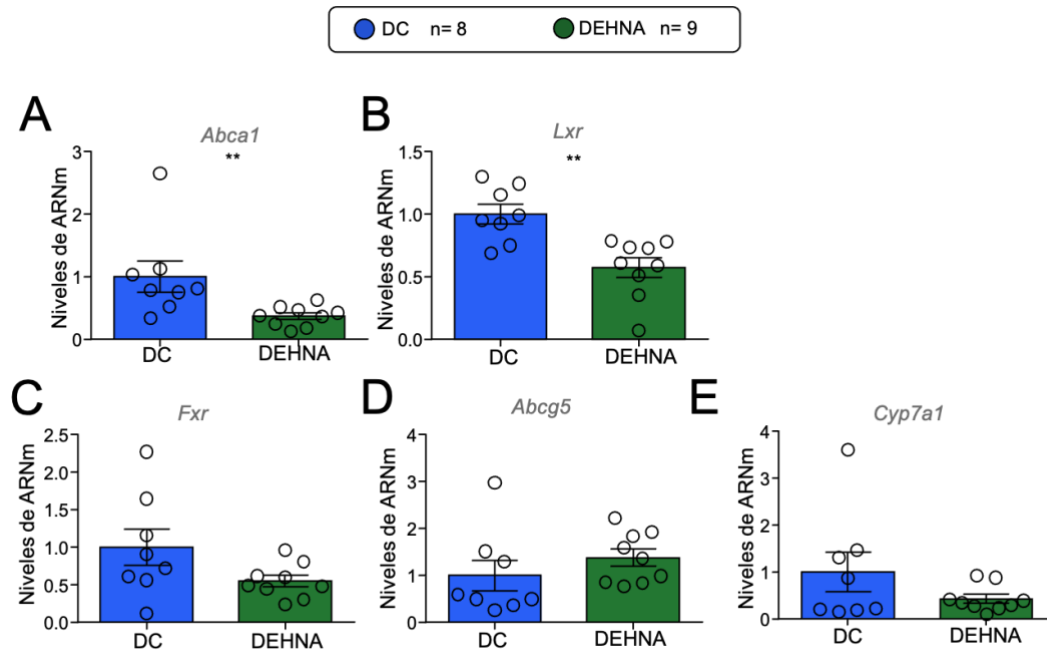


Figura 40. Expresión de genes metabólicos en hígado de ratón WT alimentado con DEHNA durante 16 semanas. Niveles de ARNm de *Abca1* (A), *Lxr* (B), *Fxr* (C), *Abcg5* (D) y *Cyp7a1* (E) normalizados con el gen endógeno *Ciclofilina* y relativizados a los niveles de ratones control WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas estadísticas t de Student's (B y C) y el test U de Mann-Whitney (A, D y E) (**p < 0.01).

El análisis de la expresión génica mostró niveles reducidos de *Chrebp*, *Ldlr* y *Hl*, genes implicados en el metabolismo del colesterol y triglicéridos, en los ratones alimentados con DEHNA respecto a los alimentados con DC (Figura 41 B-D). Sin embargo, la expresión de los niveles de *Pparg* fueron significativamente mayores en ratones alimentados con DEHNA respecto a los animales sometidos a DC (Figura 41F). No se encontraron cambios en la expresión de los genes *Srebf1* y *Ppara* entre ratones alimentados con DC y DEHNA (Figura 41 A, E).

Resultados

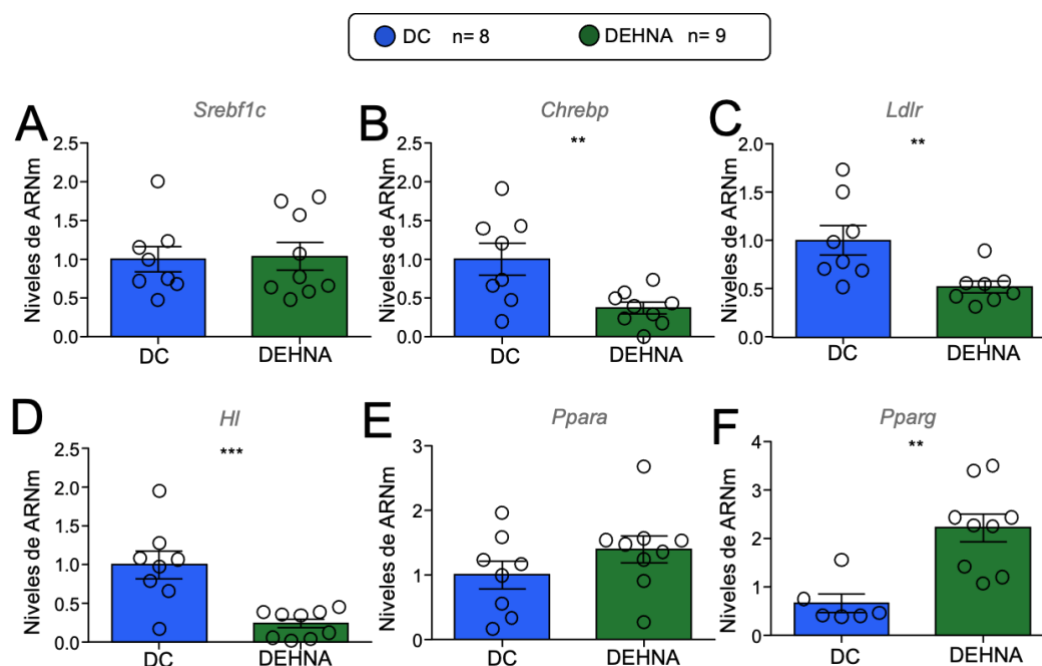


Figura 41. Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en hígado en ratones alimentados con DEHNA y DC durante 16 semanas. Niveles de ARNm de *Srebf1*(A), *Chrebp*(B), *Ldlr*(C), *Hl* (D), *Ppara*(E), y *Pparg*(F) normalizados con el gen endógeno *Ciclofilina* y relativizados a los niveles de ratones control WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas estadísticas t de Student's (A, B, D y E) y el test U de Mann-Whitney (C y F) (**p< 0.01; ***p<0.001).

A continuación, se analizaron los genes implicados en la gluconeogénesis, lipogénesis y β -oxidación [85–87] no encontrándose diferencias en la expresión de los genes *G6pase*, *Pgc1a* y *Pepck* (Figura 42 A-C) relacionados con la gluconeogénesis, ni en la expresión de *Acox* implicado en la β -oxidación (Figura 42D). Sin embargo, se observó una mayor expresión del transportador de ácidos grasos *Cd36* en los ratones alimentados con DEHNA (Figura 42E), así como una disminución de la expresión de la sintetasa de los ácidos grasos *Fasn* (Figura 42 F).

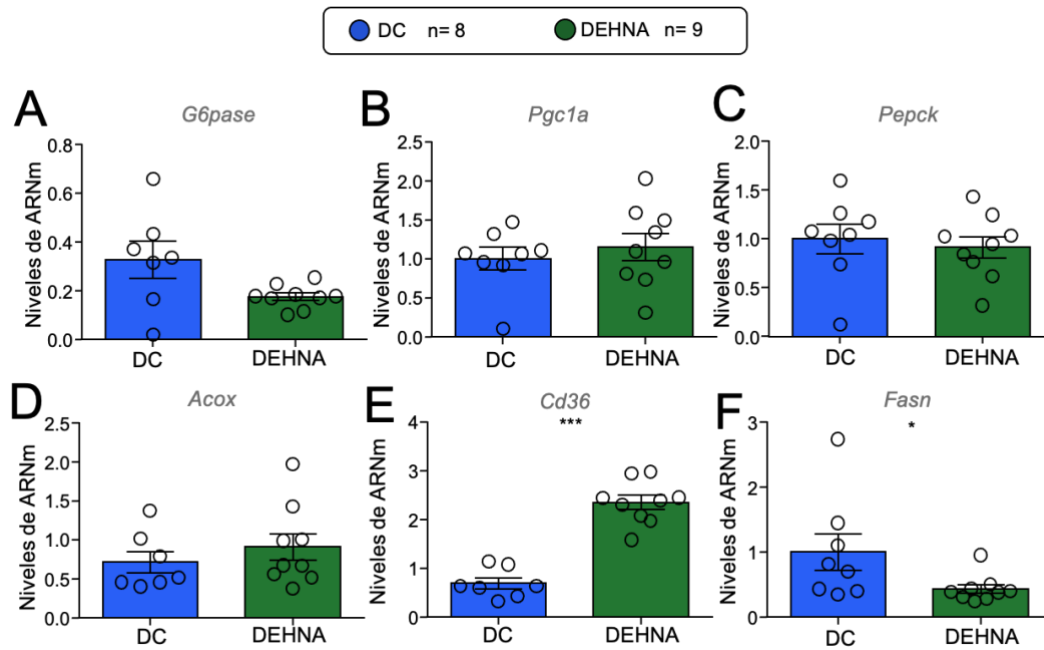


Figura 42. Expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis, lipogénesis y β -oxidación en hígado de ratones alimentados con DEHNA durante 16 semanas. Niveles de ARNm de G6pase (A), Pgc1a(B), Pepck(C), Acox(D), Cd36(E) y Fasn(F) normalizados con el gen endógeno Ciclofilina y relativizados a los niveles de ratones control WT alimentados con DC. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas estadísticas t de Student's (C) y el test U de Mann-Whitney (A, B, D, E y F) (*p< 0.05; ***p<0.001).

DISCUSIÓN

Objetivo 1: Estudio de los efectos de la dapagliflozina en un modelo murino con resistencia a insulina (RI) y aterosclerosis acelerada.

Diversos ensayos clínicos han demostrado que los fármacos antidiabéticos SGLT2i, además de disminuir los niveles de glucosa en plasma, producen un efecto protector contra el fallo cardíaco y la ECV. En este sentido, numerosos fármacos antidiabéticos ejercen un control sobre el progreso de la aterosclerosis al restaurar la homeostasis celular de las células en la placa de ateroma causada por la RI, la principal característica de la DMT2. Es por ello, que en este estudio se ha evaluado el potencial del fármaco dapagliflozina y su papel en la regulación de la aterosclerosis en condiciones de RI. Se ha investigado el efecto del fármaco en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* alimentados con una dieta rica en colesterol y grasa con la finalidad de acelerar el proceso aterosclerótico, la RI y la hipercolesterolemia.

En el **estudio del efecto de la dapagliflozina en el metabolismo en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*** se muestra que el tratamiento con dapagliflozina en ratones no produjo cambios significativos en el peso corporal, ni en los niveles basales plasmáticos de glucosa en condiciones de ayuno. La determinación de los niveles plasmáticos de insulina en condiciones de ayuno no mostró diferencias entre ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* macho tratados con vehículo o con dapagliflozina. Por el contrario, sí se observó una disminución en los niveles de insulina en las hembras tratadas con dapagliflozina. El análisis de los lípidos en plasma (colesterol total, apoB y HDL) o los niveles de triglicéridos hepáticos o en plasma tampoco mostraron diferencias entre ambos tratamientos en ninguno de los dos sexos. La dapagliflozina no produjo ningún efecto en el metabolismo de los carbohidratos analizado mediante el TTG y el TTI. No obstante, el análisis de la secreción de insulina durante el TTG mostró un incremento en los niveles de insulina en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* macho tratados con dapagliflozina comparado con los ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con vehículo. A pesar de este resultado obtenido en la secreción de insulina, los niveles de péptido C secretados durante el TTG fueron inferiores en los ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con dapagliflozina. Consistente con este último hallazgo, la secreción de insulina *ex vivo* en islotes pancreáticos aislados de ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* y tratados con dapagliflozina mostraron una disminución en el índice de secreción de insulina tras ser estimulados con glucosa. El estudio de la vía de señalización de la insulina realizado en explantes de tejido adiposo de ratones *Irs2^{+/-}* y tratados con dapagliflozina, tras ser estimulados con insulina mostraron una menor activación de la proteína AKT.

En el **estudio del efecto de la dapagliflozina en la inflamación sistémica y el desarrollo de la placa de ateroma en ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}*** los contenidos de la placa de ateroma de colágeno, CMLVs o de macrófagos no mostraron diferencias significativas respecto a los ratones tratados con vehículo. El tamaño de la lesión aterosclerótica a nivel del cayado aórtico o de la aorta torácica tampoco produjo diferencias entre ambos tratamientos. Asimismo, el análisis de los niveles de leucocitos circulantes y de citoquinas plasmáticas *in vivo* no se vio alterado por el

tratamiento con dapagliflozina. Sin embargo, en macrófagos de ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con dapagliflozina sí se observó un descenso en los niveles de expresión de *Mcp1* y del marcador *Cd206* comparado con los macrófagos tratados con vehículo.

Todos estos resultados indican que el tratamiento con dapagliflozina *in vivo* en ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* no produce un efecto protector frente a la aterosclerosis, indicando además el desarrollo de posibles alteraciones en los mecanismos de secreción de insulina de los islotes pancreáticos y en la señalización de insulina en el tejido adiposo. Lo que sugiere que este fármaco podría no ser efectivo en las complicaciones ateroscleróticas que se asocian a estados de RI en condiciones de prediabetes.

El efecto beneficioso de los fármacos SGLT2i sobre el metabolismo de carbohidratos se atribuye al efecto hipoglucemiante que generan debido a que promueven la natriuresis y la glucosuria. Así también, la pérdida de peso que producen se ha asociado al control de la glucemia y la mejora de la función renal y la disminución de la presión arterial se asocian a una acción directa de estos fármacos [88,89]. Estudios en pacientes con DMT2, el tratamiento con empagliflozina redujo los niveles de glucosa en plasma lo cual produjo una mejora tanto en la función de las células β pancreáticas como en la sensibilidad a la insulina [90]. En otro estudio realizado también en pacientes con DMT2 y tratados con dapagliflozina, la disminución de la glucemia produjo una mejora en la sensibilidad de la insulina por parte del tejido muscular sin alterar ningún otro proceso metabólico [91].

En nuestros resultados en un modelo de ratón con RI e hiperlipidemia inducida por dieta, pero sin otras características propias de la DMT2, el tratamiento con dapagliflozina no produjo cambios en los niveles de glucosa a pesar de detectarse un incremento en los niveles de insulina en plasma. Los niveles de insulina en plasma vienen determinados tanto por la secreción de los islotes pancreáticos como por la eliminación en plasma. La disminución en los niveles de péptido C observados durante el TTG indican una alteración en la secreción pancreática de insulina, lo que es coherente con la disminución en el índice de secreción de insulina obtenido en los islotes pancreáticos de ratones *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* tratados con dapagliflozina. Estos resultados sugieren que el incremento en la insulinemia en ratones tratados con dapagliflozina se debe a una degradación ineficiente de la misma, lo que además apoyaría la hipótesis de una señalización de la insulina defectuosa en aquellos tejidos sensibles a la hormona.

La eliminación y degradación defectuosa de la insulina se ha observado en pacientes de DMT2 a causa de una internalización y reciclaje anormal del receptor de la insulina INSR (del inglés *Insulin Receptor*) en tejidos sensibles a la hormona, como son el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo y el riñón [92,93]. Y estudios realizados en adipocitos maduros expuestos a niveles elevados de glucosa demostraron alteraciones en la vía de activación de señalización de la insulina por una menor afinidad de la insulina a su receptor [94]. Los resultados obtenidos en nuestra investigación sugieren que la dapagliflozina podría afectar al mecanismo de internalización del INSR interfiriendo en la señalización de la hormona en el tejido adiposo;

sin embargo, siendo hígado y músculo esquelético los principales responsables de la eliminación de la insulina, son necesarios más estudios para demostrar esta hipótesis.

En los resultados obtenidos en el efecto del tratamiento de la dapagliflozina sobre el desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica, nuestro estudio sugiere que en ratones con *Apoe*^{-/-}/*Irs2*^{+/-} con RI y en condiciones hiperlipídicas la dapagliflozina tiene un efecto limitado, sin que se hayan producido variaciones en los parámetros inflamatorios y ateroscleróticos. Estudios previos en ratones *Apoe*^{-/-} hiperglucémicos con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) y una dieta aterogénica no mostraron diferencias en los niveles de insulina en ayuno, aunque sí produjo una disminución de los niveles de glucosa. Los niveles de lípidos en sangre tampoco presentaron diferencias, sin embargo, sí se produjo una reducción en el nivel de formación de células espumosas produciéndose una disminución en el tamaño de la lesión aterosclerótica [95].

En otro estudio en ratones *Apoe*^{-/-} alimentados con una dieta Western enriquecida en grasas (41%) y en carbohidratos (43%) el tratamiento con empagliflozina produjo un descenso en el tamaño de las placas de ateroma [84]. Los autores sugieren una causa-efecto en la mejora de la RI y la reducción de la aterosclerosis; no obstante, la empagliflozina también produjo un descenso en la hiperglucemia, una reducción en el porcentaje de grasa corporal y una disminución de la esteatosis hepática, factores que aceleran los mecanismos inflamatorios y que se ven incrementados por niveles elevados de glucosa en plasma. Consistente con estos resultados, el tratamiento con dapagliflozina producía una reducción de la aterosclerosis, así como también una mejora en la lipidemia tanto en ratones *Ldlr*^{-/-} [96] como en ratones *Apoe*^{-/-} [97] en ambos casos con diabetes inducida mediante STZ y una dieta alta en colesterol.

En otras investigaciones en las que se ha empleado un tratamiento con empagliflozina [98] o con canagliflozina [99] en ratones *Apoe*^{-/-} con diabetes inducida con STZ han mostrado una mejora de la disfunción endotelial y el desarrollo de la placa de ateroma. Otros estudios han mostrado que el tratamiento con empagliflozina produjo una regresión de la aterosclerosis en ratones con diabetes inducida con STZ en un modelo de aterosclerosis inducido por inyección de oligonucleótidos *Ldlr* y *Srb1* antisentido y con una dieta alta en colesterol (1.25%) [100]. En conjunto, estos estudios muestran los beneficios de los SGLTi en un estado de hiperglucemia y sugieren que los efectos antiaterogénicos que producen estarían mediados por un descenso de los niveles de glucosa independientemente de la acción de la insulina.

Entre los mecanismos descritos para los SGLT2i se incluye una polarización en el fenotipo de macrófagos hacia un fenotipo no invasivo mediante un mecanismo dependiente del factor de transcripción STAT3 (del inglés *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*) [101,102], observándose además una mayor expresión de citoquinas en el tejido cardíaco que indican un perfil inflamatorio menos invasivo [103]. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que los análogos del péptido GLP1 (del inglés *Glucagon Like Peptide 1*) lixisenatida y liraglutida, disminuyen el tamaño de la placa de ateroma y la vulnerabilidad en ratones *Apoe*^{-/-}/*Irs2*^{+/-} mediante una disminución de los niveles de monocitos proinflamatorios Ly6c^{hi}, así como también mediante una mayor activación de STAT3 que favorece la polarización de macrófagos hacia un

fenotipo de macrófago M2 menos invasivo indicando una disminución en el tamaño de la lesión aterosclerótica [73].

Estudios *in vitro* realizados en nuestra investigación en macrófagos tratados con dapagliflozina mostraron una reducción en la expresión de la citoquina proinflamatoria *Mcp1*. Sin embargo, en los estudios *in vivo* en las células circulantes del sistema inmune, así como en el análisis del contenido de marcadores de fenotipos de macrófagos, iNOS o *Arg1*, los resultados fueron similares a los observados en el grupo tratado con vehículo. Es por ello por lo que nuestros resultados indican que, a pesar de que la dapagliflozina presenta una menor expresión de parámetros inflamatorios en macrófagos *in vitro*, éstos son irrelevantes en la modulación del fenotipo de macrófagos *in vivo* en nuestro modelo experimental de aterosclerosis con RI y en ausencia de hiperglucemia.

En resumen, nuestro estudio indica que el tratamiento con dapagliflozina no produce cambios en los niveles de glucosa en plasma ni en el desarrollo de la aterosclerosis en ratones *ApoE^{-/-}/Irs2^{+/-}* caracterizados por hipercolesterolemia y RI, pero no hiperglucemia. Además, nuestros resultados indican que la dapagliflozina produce una reducción en la secreción de insulina estimulada por glucosa *in vitro*. Esta disminución podría estar afectando a los mecanismos de eliminación de la insulina en el plasma y en tejido adiposo interfiriendo con las vías de señalización de la hormona. Por todo ello, la dapagliflozina podría no ser beneficiosa en la enfermedad vascular aterosclerótica en condiciones de RI e hipercolesterolemia.

Objetivo 2: Caracterización de un modelo murino de hígado graso inducido por una dieta rica en azúcar, grasa y colesterol.

La EHGNA es una complicación metabólica que puede desencadenarse en diversas situaciones metabólicas pero que se asocia con frecuencia a la disfunción del tejido adiposo, la RI y la DMT2. La enfermedad se caracteriza por presentar una gran variabilidad de manifestaciones en función del desarrollo de ésta, de su etiología, de los cambios histológicos e incluso de las condiciones clínicas del paciente. Los modelos preclínicos existentes no recapitulan todas las características de la patología humana por lo que disponer de un modelo de ratón que permita identificar los procesos moleculares asociados a esta patología es indispensable para poder desarrollar posibles dianas terapéuticas. En la presente investigación se ha investigado en ratones *WT* el efecto de una dieta inductora de EHNA, DEHNA, rica en grasa (21%) y azúcar (41.5%), carga metabólica que representa un desafío hepático, y alto contenido en colesterol (1.25%), cuyos efectos se asocian con una mayor inflamación sistémica y hepática [77].

Tras 16 semanas de tratamiento los ratones con DEHNA mostraron una disminución en el peso y en los niveles de ácidos grasos libres y una mejora en la sensibilidad a la insulina en los ratones tratados con DEHNA. Sin embargo, éstos desarrollaron mayor peso hepático y un aumento en el daño hepático, la esteatosis, inflamación lobular, degeneración balonzante y

fibrosis, así como una puntuación NAS coherente con la presencia de estadio avanzado de esteatosis o EHNA. El análisis de la inflamación hepática mostró además un aumento de linfocitos T y de macrófagos proinflamatorios CD11c. El análisis de la inflamación sistémica sin embargo mostró una disminución de monocitos totales y de los inflamatorios Ly6C^{hi} y un aumento de los linfocitos T citotóxicos, de los subtipos proinflamatorios Th1 y Th9 y de los B. El análisis de la expresión génica hepática mostró una alteración del patrón de la expresión génica consistente con mayor fibrosis, y un desequilibrio del metabolismo del colesterol, triglicéridos y de la síntesis de ácidos grasos. Nuestros resultados indican, que la DEHNA administrada en ratones WT durante 16 semanas genera un modelo de EHNA avanzado con fibrosis, niveles elevados de inflamación y alteraciones metabólicas importantes que cursan con pérdida de peso y una aparente mejora de la sensibilidad a la insulina.

Muchas de las dietas aterogénicas o ricas en grasa o hidratos de carbono empleadas para emular las condiciones propias de la EHNA se caracterizan porque acaban originando adiposidad, hígado graso y dislipidemia, pero sin obtener la fibrosis propia de la enfermedad [104]. Dietas con deficiencias en algunos nutrientes como la DDMC replican las características histológicas de la esteatohepatitis y fibrosis observadas en la EHNA en humanos, pero difiere de ella en que los ratones sufren pérdida de peso, bajos niveles de glucosa en ayuno, sensibilidad periférica a la insulina con disminución en los niveles de insulina, TG y colesterol, siendo un perfil metabólico opuesto a la enfermedad humana, sin presentar además el patrón inflamatorio caracterizado por un incremento de citoquinas en plasma [45,74]. Nuestro modelo de dieta se caracteriza también por una pérdida de peso y una aparente mejora de la sensibilidad a la insulina. Este hipercatabolismo podría ser atribuido a un incremento de la actividad simpática que actúa sobre el tejido adiposo produciendo una mayor sensibilidad a la insulina [74]. Sin embargo, a diferencia de la DDMC, los ratones WT alimentados con nuestra DEHNA, en comparación con los ratones con DC, mostraron hepatomegalia, un incremento de los parámetros histopatológicos con presencia de esteatosis, inflamación lobular y degeneración balonizante. Además, la DEHNA utilizada en este estudio produjo unos niveles de fibrosis aumentados en los ratones WT y una puntuación NAS de 6, muy superior al valor de 3 observado en condiciones de EHNA. Estos resultados fueron consistentes con el incremento en los contenidos hepáticos de fibrosis, linfocitos T CD3+, en triglicéridos y en macrófagos proinflamatorios F4/80+CD11c+.

El análisis de la inflamación sistémica mostró resultados que contrastan con los hallazgos en el tejido hepático. Así, los ratones WT alimentados con DEHNA mostraron unos niveles elevados de monocitos no invasivos CD115+Ly6C^{lo} y una disminución en los niveles del subtipo proinflamatorio CD115+Ly6C^{hi}. Sin embargo, estos resultados están en la línea de otros datos obtenidos de ratones WT alimentados con DDMC que demuestran un incremento de los monocitos hepáticos a expensas de los proinflamatorios circulantes en plasma [105]. Las otras poblaciones analizadas mostraron mayores niveles de células CD8+T citotóxicas muy

importantes en la transición EHGNA a EHNA [106] y en linfocitos B asociados con la progresión a estadios fibróticos en la EHNA en pacientes [107].

La alimentación con DEHNA en ratones *WT*, a pesar de que no produjo cambios en los niveles de colesterol HDL, apoB o triglicéridos, sí que produjo cambios en los niveles de colesterol total observándose un incremento de estos. Sorprendentemente los niveles de ácidos grasos libres NEFA se vieron disminuidos respecto al grupo alimentado con DC. Estos resultados son coherentes con la pérdida de peso y con los obtenidos en la expresión de los genes gluconeogénicos *G6pase*, *Pgc1a* y *Pepck* y el gen de la β -oxidación *Acox*, los cuales no presentaban diferencias entre ambas dietas, ya que la expresión de estos se relaciona con niveles elevados de NEFA en plasma [55].

En los ratones alimentados con DEHNA se observó una reducción de los niveles de expresión de *Lxr* y *Abca1* cuyas actividades se relacionan con el almacenamiento defectuoso de lípidos y la acumulación de colesterol hepático, respectivamente, en la EHGNA. Asimismo, no se observaron diferencias en la expresión de *Srebf1c*, pero sí hubo una disminución en los niveles de *Chrebp* y *Ldlr*, proteínas relacionadas con la lipogénesis y la captura de lípidos, y también disminuyeron los niveles de la sintetasa de los ácidos grasos *Fasn* [108,109]. La desregulación de estas vías de expresión conduce a una sobrecarga de colesterol en hígado y sistémico y al consiguiente desarrollo de estrés hepático y aterosclerosis [110]. Estos resultados son coherentes dado que el factor transcripcional *Srebf-1c* es estimulado gracias a la insulina o a ChREBP, y nuestro modelo de dieta no sólo no presentó diferencias en la secreción de insulina durante el TTG respecto a la DC, sino que además los niveles de péptido C durante esta prueba fueron inferiores, lo cual indica una menor producción de insulina. SREBF-1C induce la expresión de genes lipogénicos como *Fasn*, el cual se muestra disminuido respecto a los animales con DC. FASN cataliza el último paso en la síntesis de AG y se considera un determinante de la máxima capacidad que puede alcanzar el hígado en la producción de AG mediante la LDN. Estudios previos realizados en un modelo murino de esteatohepatitis presentaban diferencias en ratones con esteatosis, pero sin inflamación, sin embargo, los ratones con EHNA no presentaron diferencias respecto al control [111]. Por otro lado, pacientes obesos con un incremento en la LDN que favorece el depósito de grasa, presentan una disminución en la expresión de FASN en el tejido adiposo [112], lo que sugiere una reducción de la lipogénesis pudiendo actuar como mecanismo compensatorio debido al exceso de ácidos grasos en hígado.

La expresión de la proteína ChREBP se activa por la acción de la glucosa e induce la lipogénesis. Los bajos niveles de péptido C observados durante el TTG sugieren una menor captación de glucosa lo cual podría conducir a menor expresión de esta proteína. Por otro lado, la disminución de los niveles de *Chrebp* explican los bajos niveles de *Lxr*, ya que se conoce la regulación de este factor por parte de ChREBP, y por tanto también, los niveles menores o no significativos de *Cyp7a1*, *Abca1* y *Abcg5*, regulados todos ellos por *Lxr* [113,114]. La ausencia de diferencias en los niveles de expresión de *Fxr* entre ambas dietas, junto a los bajos niveles de *Ldlr* y *Hl* en los ratones alimentados con dieta EHNA se relacionan con la

Discusión

esteatosis y los elevados contenidos en TG en el hígado, ya que los niveles elevados de *Fxr* tienen un papel protector en el desarrollo de la EHNA [76,115]. Por otro lado, los altos niveles de expresión en *Cd36*, transportador de AG en el hígado, se correlaciona con lo observado en pacientes de EHNA y en modelos murinos que sobreexpresan esta proteína [114].

La expresión de *Ppara* no se vio afectada, pero sí la de *Pparγ* la cual se mostró incrementado en ratones con DEHNA respecto a DC. Estos valores se relacionan con esteatohepatitis, así como con la activación de la expresión de genes adipogénicos que conducen a una mayor acumulación de lípidos en hígado inducido [116].

Estudios previos en pacientes con EHNA el análisis de citoquinas con la finalidad de obtener el contenido de células Th y macrófagos hepáticos en biopsias hepáticas, mostró un incremento el cociente de los linfocitos efectores Th1 (proinflamatorios) / Th2 (anti-inflamatorios) con una clara polarización hacia el fenotipo proinflamatorio Th1, siendo esta polarización mayor aún en pacientes que presentaban además DMT2. Asimismo, se pudo observar un incremento en la ratio de macrófagos hepáticos proinflamatorios/anti-inflamatorios y una disminución en el cociente de IL10/IL17, citoquinas asociadas a los niveles de células Treg y Th17, respectivamente [117]. El tratamiento con DEHNA de ratones WT aumentó los niveles de linfocitos circulantes Th1 respecto a los ratones alimentados con DC, sin observarse variaciones en los niveles de linfocitos Th2, Th17 o Treg entre ambos tipos de dieta. Sin embargo, la expresión génica en el hígado de ratones tratados con DEHNA, mostró un aumento del factor transcripcional *Foxp3* y una disminución del factor transcripcional *Rorc*, relevantes en la diferenciación de las células Treg y Th17, resultados que contradicen los descritos en humanos. Las determinaciones en sangre también mostraron un aumento de los linfocitos Th9 en ratones WT alimentados con DEHNA. Cabe señalar que este subtipo celular se ve incrementado en enfermedades inflamatorias y autoinmunes con la consiguiente producción de IL9, citoquina también relacionada con el incremento de células CD8+ citotóxicas en sangre [118], también aumentadas en nuestro modelo experimental de EHNA. Todos estos resultados en conjunto indican una mayor inflamación sistémica y hepática.

No se observó en plasma diferencias en las poblaciones de células NK y NKT, sin embargo, en el hígado el gen *Zbtb16*, factor transcripcional determinante para los linfocitos NKT, mostró una disminución en los niveles de expresión en ratones alimentados con DEHNA. Estas células son cruciales en la respuesta inmune generada por daño hepático ya que inducen la activación de células estrelladas para mejorar la fibrosis, por lo que una menor expresión de *Zbtb16* indica una menor respuesta a la inflamación. Nuestros resultados contrastan con estudios previos descritos por nosotros en ratones WT alimentados con una dieta alta en grasa y en colesterol (DAGAC) los cuales mostraron niveles de expresión aumentados de *Zbtb16*, niveles reducidos de *Foxp3* y mayor esteatosis, pero niveles de fibrosis casi indetectables y una puntuación NAS baja [77]. Estos resultados sugieren la existencia de patrones de expresión génica diferencial de los factores determinantes en el fenotipo inmune durante el curso de la enfermedad

probablemente relacionado con la transición de hígado graso leve a EHGNA, y de EHGNA a EHNA.

El estudio de la expresión de los genes relacionados con la fibrosis *Col1a1*, *Mmp9* y *Acta2* no presentaron diferencias, pero *Tgf β 1* y *Timp1* presentaron unos niveles más elevados en ratones alimentados con DEHNA, indicando diferenciación de las células estrelladas hepáticas hacia miofibroblatos. Estos marcadores, *Tgf β 1* y *Timp1*, son considerados determinantes como marcadores para el diagnóstico de EHNA [119]. Cabe señalar que, en nuestro estudio mencionado anteriormente, consistente con niveles bajos de fibrosis no se encontraron diferencias en ninguno de los genes de fibrosis [77]. Por lo que, la comparación de nuestros estudios indica que la nueva dieta EHNA explorada en este estudio activa los genes de fibrosis y sugieren que estudios en este sentido podrían desvelar dianas terapéuticas nuevas para prevenir la fibrosis.

Los factores de transcripción SREBP1 y ChREBP son reguladores clave del incremento en la expresión de los genes lipogénicos característico de pacientes y roedores con EHGNA. La disminución en la secreción de insulina a causa de la alimentación con DEHNA junto a una mayor sensibilidad a la hormona podría sugerir una disfunción de las células β -pancreáticas y una alteración en la vía génica conocida de la enfermedad, activándose vías alternativas que han conducido a la generación de fibrosis y un patrón inflamatorio típico de la EHNA. Además, la reducción de los niveles de *Lxr* y *Abca1*, relacionados con el incremento de TG observado en el hígado, y la presencia de células inflamatorias tanto en plasma como en hígado, sugieren un perfil de daño hepático y de fibrosis característico del progreso de EHGNA a EHNA.

En resumen, la dieta empleada en este estudio a 16 semanas no es adecuada para el estudio de la esteatosis asociada a RI. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el tratamiento con la DEHNA de esta investigación durante 16 semanas podría ser un modelo válido y útil para la identificación de factores que actúan durante el progreso hacia el estadio más avanzado de hígado graso, la EHNA. Por otro lado, la DEHNA produjo un daño hepático importante, una fibrosis avanzada e inflamación en un tiempo menor que otras dietas como la Western y que podrían ser empleados para identificar genes determinantes en la transición EHGNA a EHNA para frenar el avance de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. En ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* alimentados con dieta aterogénica que desarrollan RI e hipercolesterolemia, pero no hiperglucemia, la dapagliflozina no produce ningún efecto en los parámetros inflamatorios ni en el desarrollo de la aterosclerosis.
2. La dapagliflozina disminuye la vía de señalización de insulina *ex vivo* en tejido adiposo en ratones *Irs2^{+/-}*.
3. El tratamiento con dapagliflozina disminuye el índice de secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratones *Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}* *in vitro*.
4. La administración de DEHNA a ratones *WT* durante 16 semanas no es una aproximación experimental adecuada para el estudio de EHNA asociada a la obesidad y la RI ya que produce pérdida de peso y una aparente mejora de la sensibilidad a la insulina.
5. La alimentación de ratones *WT* con DEHNA durante 16 semanas es una metodología adecuada para estudiar el daño hepático avanzado caracterizado por fibrosis y por esteatosis inflamatoria avanzada con infiltración importante de macrófagos proinflamatorios y linfocitos T.
6. La alimentación de ratones *WT* con DEHNA es una estrategia metodológica dietética adecuada para el estudio y la identificación de patrones de expresión génica determinantes en la transición de EHGNA a EHNA como son por ejemplo los genes de fibrosis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chen L, Islam RM, Wang J, Hird TR, Pavkov ME, Gregg EW, et al. A systematic review of trends in all-cause mortality among people with diabetes. *Diabetologia* 2020;63:1718–35. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05199-0>.
- [2] Thomas CC, Philipson LH. Update on Diabetes Classification. *Med Clin North Am* 2015;99:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.015>.
- [3] Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Salpea P. IDF Atlas 9th edition and other resources. *Int Diabetes Fed* 2019;9th editio:1–176.
- [4] Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Review: Biochemistry. 7th ed. 2017. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(87\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(87)90018-5).
- [5] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet* 2017;389:2239–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2).
- [6] Care D, Suppl SS. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020;43:S14–31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>.
- [7] Di Pino A, DeFronzo RA. Insulin Resistance and Atherosclerosis: Implications for Insulin Sensitizing Agents. *Endocr Rev* 2019;1447–67. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00141>.
- [8] Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2003;285. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00253.2003>.
- [9] Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 2014;383:1068–83. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6).
- [10] Höppener JWM, Ahrén B, Lips CJM. Islet Amyloid and Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2000;343:411–9. <https://doi.org/10.1056/nejm200008103430607>.
- [11] Kashyap SR, Belfort R, Berria R, Suraamornkul S, Pratipranawatr T, Finlayson J, et al. Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2004;287:537–46. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00541.2003>.
- [12] Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipranawatr T, Berria R, et al. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 2005;54:1640–8. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1640>.
- [13] Boden G. Fatty acid - Induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 2006;6:177–81. <https://doi.org/10.1007/s11892-006-0031-x>.
- [14] Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular disease statistics 2017. *Eur Heart J* 2018;39:508–77. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx628>.

- [15] Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular endothelial cell biology: An update. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>.
- [16] Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*, 7e 2016.
- [17] Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis: Figure 1. *Clin Sci* 2013;125:221–35. <https://doi.org/10.1042/CS20120576>.
- [18] Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Prim* 2019;5:1–18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.
- [19] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev* 2013;93:1317–542. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2012>.
- [20] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317–25. <https://doi.org/10.1038/nature10146>.
- [21] Aguilar-Ballester M, Herrero-Cervera A, Vinué A, Martínez-Hervás S, Gonzalez-Navarro H. Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis 2020:1–19.
- [22] Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, Yang Z, Lee JK, Jackson CL, et al. Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 2012;122:70–9. <https://doi.org/10.1172/JCI43713>.
- [23] Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014;114:1852–66. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>.
- [24] Silvestre-Roig C, De Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: Mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res* 2014;114:214–26. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302355>.
- [25] Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2001;103:1051–6. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.8.1051>.
- [26] Ruiz JL, Weinbaum S, Aikawa E, Hutcheson JD. Zooming in on the genesis of atherosclerotic plaque microcalcifications. *J Physiol* 2016;594:2915–27. <https://doi.org/10.1113/JP271339>.
- [27] Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: Glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004;141. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-141-6-200409210-00007>.

- [28] Fruchart JC, Davignon J, Hermans MP, Al-Rubeaan K, Amarencu P, Assmann G, et al. Residual macrovascular risk in 2013: What have we learned? *Cardiovasc Diabetol* 2014;13. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-26>.
- [29] Ruiz-García A, Arranz-Martínez E, Morón-Merchante I, Pascual-Fuster V, Tamarit JJ, Trias-Villagut F, et al. Documento de consenso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA) para la prevención y tratamiento de la enfermedad cardiovascular en la diabetes mellitus tipo 2. *Clínica e Investig En Arterioscler* 2018;30:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.06.006>.
- [30] Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran L V., Cong LN, Kirby M, Mostowski H, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000;101:1539–45. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.13.1539>.
- [31] King GL, Park K, Li Q. Selective insulin resistance and the development of cardiovascular diseases in diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes* 2016;65:1462–71. <https://doi.org/10.2337/db16-0152>.
- [32] Bornfeldt KE. Uncomplicating the macrovascular complications of diabetes: The 2014 edwin bierman award lecture. *Diabetes* 2015;64:2689–97. <https://doi.org/10.2337/db14-1963>.
- [33] Baumgartl J, Baudler S, Scherner M, Babaev V, Makowski L, Suttles J, et al. Myeloid lineage cell-restricted insulin resistance protects apolipoproteinE-deficient mice against atherosclerosis. *Cell Metab* 2006;3:247–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.010>.
- [34] Han S, Liang CP, DeVries-Seimon T, Ranalletta M, Welch CL, Collins-Fletcher K, et al. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab* 2006;3:257–66. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.008>.
- [35] Martínez-Hervás S, Vinué A, Núñez L, Andrés-Blasco I, Piqueras L, Real JT, et al. Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc Res* 2014;103:324–36. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu115>.
- [36] van Dijk RA, Duiniveld AJF, Schaapherder AF, Mulder-Stapel A, Hamming JF, Kuiper J, et al. A change in inflammatory footprint precedes plaque instability: A systematic evaluation of cellular aspects of the adaptive immune response in human atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2015;4. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001403>.
- [37] Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* 2017;377:13–27. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1614362>.

Bibliografía

- [38] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- [39] Tuyama AC, Chang CY. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes* 2012;4:266–80. <https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2012.00204.x>.
- [40] Gonzalez A, Huerta-Salgado C, Orozco-Aguilar J, Aguirre F, Tacchi F, Simon F, et al. Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1617805>.
- [41] Carr RM, Ahima RS, Quispe-Tintaya W. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Physiol Behav* 2017;176:139–48. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.021>.Pathophysiology.
- [42] Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2017;65:1557–65. <https://doi.org/10.1002/hep.29085>.
- [43] Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:411–28. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>.
- [44] Reeves HL, Zaki MYW, Day CP. Hepatocellular Carcinoma in Obesity, Type 2 Diabetes, and NAFLD. *Dig Dis Sci* 2016;61:1234–45. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4085-6>.
- [45] Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci* 2016;61:1325–36. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>.
- [46] Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese R V, Diseases C, Boston LA, et al. Lipid droplets and liver disease: From basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:343–55. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.32>.
- [47] Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012;142:711–725.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>.
- [48] Marchisello S, Di Pino A, Scicali R, Urbano F, Piro S, Purrello F, et al. Pathophysiological, molecular and therapeutic issues of nonalcoholic fatty liver disease: An overview. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20081948>.
- [49] Duval C, Thissen U, Keshtkar S, Accart B, Stienstra R, Boekschoten M V., et al. Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57Bl/6 mice. *Diabetes* 2010;59:3181–91. <https://doi.org/10.2337/db10->

- 0224.
- [50] Hattang M, Tacke F. From NAFLD to HCC: Is IL-17 the crucial link? *Hepatology* 2017;65:739–41. <https://doi.org/10.1002/hep.28934>.
- [51] Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, Tummala KS, Yilmaz M, Waisman A, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 2016;30:161–75. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.020>.
- [52] Vonghia L, Van Herck MA, Weyler J, Francque S. Targeting myeloid-derived cells: New frontiers in the treatment of non-alcoholic and alcoholic liver disease. *Front Immunol* 2019;10:563. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00563>.
- [53] Torres-Hernandez A, Wang W, Nikiforov Y, Tejada K, Torres L, Kalabin A, et al. $\gamma\delta$ T Cells Promote Steatohepatitis by Orchestrating Innate and Adaptive Immune Programming. *Hepatology* 2020;71:477–94. <https://doi.org/10.1002/hep.30952>.
- [54] Koyama Y, Brenner DA, Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis Liver inflammation and fibrosis 2017;127:55–64. <https://doi.org/10.1172/JCI88881.orders>.
- [55] Geisler CE, Renquist BJ. Hepatic lipid accumulation: Cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol* 2017;234:R1–21. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0513>.
- [56] Watanabe, Akira; Choe, Seungho; Chaptal, Vincent; Rosenberg, John M.; Wright, Ernest M.; Grabe M and AJ. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* 2010;468:988–91. <https://doi.org/10.1038/nature1371>.
- [57] Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 2011;91:733–94. <https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2009>.
- [58] Ghezzi C, Loo DDF, Wright EM. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2 Online Mendelian Inheritance in Man. *Diabetologia* 2018;1:2087–97.
- [59] Koepsell H. The Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 are targets for the treatment of diabetes and cancer. *Pharmacol Ther* 2017;170:148–65. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.017>.
- [60] Rieg T, Vallon V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. *Diabetology* 2018;1–2857.
- [61] Bakris GL, Fonseca VA, Sharma K, Wright EM. Renal sodium-glucose transport: Role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int* 2009;75:1272–7. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.87>.
- [62] Wiviott S, Langkilde A -M, Leiter L, Gause-Nilsson I, Cahn A, Bhatt DL, et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J*

- Med 2019;380:347–57. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1812389>.
- [63] Meng W, Ellsworth BA, Nirschl AA, McCann PJ, Patel M, Girotra RN, et al. Discovery of dapagliflozin: A potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* 2008;51:1145–9. <https://doi.org/10.1021/jm701272q>.
- [64] Tahara A, Takasu T, Yokono M, Imamura M, Kurosaki E. Characterization and comparison of SGLT2 inhibitors: Part 3. Effects on diabetic complications in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2017;809:163–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.019>.
- [65] Lee DM, Battson ML, Jarrell DK, Hou S, Ecton KE, Weir TL, et al. SGLT2 inhibition via dapagliflozin improves generalized vascular dysfunction and alters the gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2018;17:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0708-x>.
- [66] Gaspari T, Spizzo I, Liu H, Hu Y, Simpson RW, Widdop RE, et al. Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis. *Diabetes Vasc Dis Res* 2017;147916411773362. <https://doi.org/10.1177/1479164117733626>.
- [67] Nassif ME, Windsor S, Tang F, Khariton Y, Husain M, Inzucchi S, et al. Dapagliflozin effects on biomarkers, symptoms, and functional status in patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Circulation* 2019;140:1463–76. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042929>.
- [68] Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.507>.
- [69] Breslow JL. Mouse Models of Atherosclerosis. *Science* (80-) 1996;272. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.685>.
- [70] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14:133–40. <https://doi.org/10.1161/01.atv.14.1.133>.
- [71] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900–4. <https://doi.org/10.1038/36116>.
- [72] González-Navarro H, Vinué Á, Vila-Caballer M, Fortuño A, Beloqui O, Zalba G, et al. Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: Role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2187–94. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.175299>.
- [73] Vinué Á, Navarro J, Herrero-Cervera A, García-Cubas M, Andrés-Blasco I, Martínez-Hervás S, et al. The GLP-1 analogue lixisenatide decreases atherosclerosis in insulin-

- resistant mice by modulating macrophage phenotype. *Diabetologia* 2017;60:1801–12. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4330-3>.
- [74] Machado MV, Michelotti GA, Xie G, De Almeida TP, Boursier J, Bohnic B, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One* 2015;10:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127991>.
- [75] Vinué Á, Herrero-Cervera A, González-Navarro H. Understanding the impact of dietary cholesterol on chronic metabolic diseases through studies in rodent models. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/nu10070939>.
- [76] Andrés-Blasco I, Herrero-Cervera A, Vinué Á, Martínez-Hervás S, Piqueras L, Sanz MJ, et al. Hepatic lipase deficiency produces glucose intolerance, inflammation and hepatic steatosis. *J Endocrinol* 2015;227:179–91. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0219>.
- [77] Herrero-Cervera A, Vinué Á, Burks DJ, González-Navarro H. Genetic inactivation of the LIGHT (TNFSF14) cytokine in mice restores glucose homeostasis and diminishes hepatic steatosis. *Diabetologia* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4962-6>.
- [78] Andrés-Blasco I, Vinué A, Herrero-Cervera A, Martínez-Hervás S, Nuñez L, Piqueras L, et al. Hepatic lipase inactivation decreases atherosclerosis in insulin resistance by reducing LIGHT/lymphotoxin beta-receptor pathway. *Thromb Haemost* 2016;116:379–93. <https://doi.org/10.1160/TH15-10-0773>.
- [79] Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, et al. Muscle-specific PPAR γ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2003;112:608–18. <https://doi.org/10.1172/JCI17305>.
- [80] González-Navarro H, Vinué Á, Sanz MJ, Delgado M, Pozo MA, Serrano M, et al. Increased dosage of Ink4/Arf protects against glucose intolerance and insulin resistance associated with aging. *Aging Cell* 2013;12:102–11. <https://doi.org/10.1111/accel.12023>.
- [81] Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [82] Palmer I, Wingfield PT. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci* 2004;38. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s38>.
- [83] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [84] Han JH, Oh TJ, Lee G, Maeng HJ, Lee DH, Kim KM, et al. The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice fed a western

- diet. *Diabetologia* 2017;364–76. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4158-2>.
- [85] Noguchi R, Kubota H, Yugi K, Toyoshima Y, Komori Y, Soga T, et al. The selective control of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenesis by temporal insulin patterns. *Mol Syst Biol* 2013;9:664. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.19>.
- [86] Ouali F, Djouadi F, Merlet-Bénichou C, Riveau B, Bastin J. Regulation of fatty acid transport protein and mitochondrial and peroxisomal β -oxidation gene expression by fatty acids in developing rats. *Pediatr Res* 2000;48:691–6. <https://doi.org/10.1203/00006450-200011000-00023>.
- [87] Mendes KL, De Pinho L, Andrade JMO, Paraíso AF, Lula JF, MacEdo SM, et al. Distinct metabolic effects of resveratrol on lipogenesis markers in mice adipose tissue treated with high-polyunsaturated fat and high-protein diets. *Life Sci* 2016;153:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.04.014>.
- [88] Lim VG, Bell RM, Arjun S, Kolatsi-Joannou M, Long DA, Yellon DM. SGLT2 Inhibitor, Canagliflozin, Attenuates Myocardial Infarction in the Diabetic and Nondiabetic Heart. *JACC Basic to Transl Sci* 2019;4:15–26. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.10.002>.
- [89] Beitelshes AL, Leslie BR, Taylor SI. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors: A case study in translational research. *Diabetes* 2019;68:1109–20. <https://doi.org/10.2337/dbi18-0006>.
- [90] Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 2014;124:499–508. <https://doi.org/10.1172/JCI72227>.
- [91] Merovci A, Solis-Herrera C, Daniele G, Eldor R, Vanessa Fiorentino T, Tripathy D, et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J Clin Invest* 2014;124:509–14. <https://doi.org/10.1172/JCI70704>.
- [92] Chen Y, Huang L, Qi X, Chen C. Insulin receptor trafficking: Consequences for insulin sensitivity and diabetes. *Int J Mol Sci* 2019;20:5007. <https://doi.org/10.3390/ijms20205007>.
- [93] Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: Progress and potential. *Endocr Rev* 1998;19:608–24. <https://doi.org/10.1210/er.19.5.608>.
- [94] Palacios-Ortega S, Varela-Guruceaga M, Martínez JA, de Miguel C, Milagro FI. Effects of high glucose on caveolin-1 and insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Adipocyte* 2016;5:65–80. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1122856>.
- [95] Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Nagashima M, Kushima H, et al. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and

- type 2 diabetic mice. *PLoS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143396>.
- [96] Al-Sharea A, Murphy AJ, Huggins LA, Hu Y, Goldberg IJ, Nagareddy PR. SGLT2 inhibition reduces atherosclerosis by enhancing lipoprotein clearance in *Ldlr*^{-/-} type 1 diabetic mice. *Atherosclerosis* 2018;271:166–76. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.028>.
- [97] Leng W, Ouyang X, Lei X, Wu M, Chen L, Wu Q, et al. The SGLT-2 Inhibitor Dapagliflozin Has a Therapeutic Effect on Atherosclerosis in Diabetic ApoE^{-/-} Mice. *Mediators Inflamm* 2016;2016.
- [98] Ganbaatar B, Fukuda D, Shinohara M, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, et al. Empagliflozin ameliorates endothelial dysfunction and suppresses atherogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2020;875:173040. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173040>.
- [99] Rahadian A, Fukuda D, Salim HM, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, et al. Canagliflozin prevents diabetes-induced vascular dysfunction in apoe-deficient mice. *J Atheroscler Thromb* 2020;27:1141–51. <https://doi.org/10.5551/jat.52100>.
- [100] Pennig J, Scherrer P, Gissler MC, Anto-Michel N, Hoppe N, Fünér L, et al. Glucose lowering by SGLT2-inhibitor empagliflozin accelerates atherosclerosis regression in hyperglycemic STZ-diabetic mice. *Sci Rep* 2019;9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54224-9>.
- [101] Chin KL, Ofori-asenso R, Hopper I, Lueder TG Von, Reid CM, Zoungas S, et al. Potential mechanisms underlying the cardiovascular benefits of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors : a systematic review of data from preclinical studies. *Eur Soc Cardiol* 2019:266–76. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy295>.
- [102] Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med* 2017;104:298–310. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.035>.
- [103] Radlinger B, Hornsteiner F, Folie S, Salvenmoser W, Haubner BJ, Schuetz T, et al. Cardioprotective effects of short-term empagliflozin treatment in db/db mice. *Sci Rep* 2020;10:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76698-8>.
- [104] Hansen HH, Feigh M, Veidal SS, Rigbolt KT, Vrang N, Fosgerau K. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discov Today* 2017;22:1707–18. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.007>.
- [105] Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL, Møller HJ, Vilstrup H, George J, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis.

- Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2019;16:145–59. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0082-x>.
- [106] Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* 2014;26:549–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>.
- [107] Bruzzi S, Sutti S, Giudici G, Burlone ME, Ramavath NN, Toscani A, et al. B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free Radic Biol Med* 2018;124:249–59. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.015>.
- [108] Joyce CW, Wagner EM, Basso F, Amar MJ, Freeman LA, Shamburek RD, et al. ABCA1 overexpression in the liver of LDLr-KO mice leads to accumulation of pro-atherogenic lipoproteins and enhanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 2006;281:33053–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604526200>.
- [109] Zhao XY, Xiong X, Liu T, Mi L, Peng X, Rui C, et al. Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD pathogenesis. *Nat Commun* 2018;9:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05383-2>.
- [110] Ito A, Hong C, Oka K, Salazar J V., Diehl C, Witztum JL, et al. Cholesterol Accumulation in CD11c + Immune Cells Is a Causal and Targetable Factor in Autoimmune Disease. *Immunity* 2016;45:1311–26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.11.008>.
- [111] Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3:505–14.
- [112] Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014;63:895–902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>.
- [113] Daniel PV, Mondal P. Causative and Sanative dynamicity of ChREBP in Hepato-Metabolic disorders. *Eur J Cell Biol* 2020;99:151128. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151128>.
- [114] Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2013;48:434–41. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>.
- [115] Armstrong LE, Guo GL. Role of FXR in Liver Inflammation During Nonalcoholic Steatohepatitis. *Curr Pharmacol Reports* 2017;3:92–100. <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0085-2>.
- [116] Liss KHH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* 2017;136:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.009>.

- [117] Vonghia L, Magrone T, Verrijken A, Michielsen P, Van Gaal L, Jirillo E, et al. Peripheral and hepatic vein cytokine levels in correlation with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-related metabolic, histological, and haemodynamic features. *PLoS One* 2015;10:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143380>.
- [118] Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01142>.
- [119] Ding ZM, Xiao Y, Wu X, Zou H, Yang S, Shen Y, et al. Progression and regression of hepatic lesions in a mouse model of NASH induced by dietary intervention and its implications in pharmacotherapy. *Front Pharmacol* 2018;9:1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00410>.

ANEXO

Publicación de la tesis

Título: Dapagliflozin Does Not Modulate Atherosclerosis in Mice with Insulin Resistance

Autores: Taberner-Cortes A, Vinué A, Herrero-Cervera A, Aguilar-Ballester M

Revista: *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9216. doi:10.3390/ijms21239216

Publicaciones durante el período de tesis

Título: Therapies for the Treatment of Cardiovascular Disease Associated with Type 2 Diabetes and Dyslipidemia

Autores: Aguilar-Ballester M, Hurtado-Genovés G, Taberner-Cortés A, Herrero-Cervera A

Revista: *Int J Mol Sci.* 2021;1–27. doi.org/10.3390/ijms22020660



Article

Dapagliflozin Does Not Modulate Atherosclerosis in Mice with Insulin Resistance

Alida Taberner-Cortés ¹, Ángela Vinué ¹, Andrea Herrero-Cervera ¹, María Aguilar-Ballester ¹, José Tomás Real ^{1,2,3,4}, Deborah Jane Burks ^{4,5}, Sergio Martínez-Hervás ^{1,2,3,4} and Herminia González-Navarro ^{1,4,*}

¹ Health Research Institute Clinic Hospital of Valencia-INCLIVA, 46010 Valencia, Spain; altacor@doctor.upv.es (A.T.-C.); m.angela.vinue@uv.es (Á.V.); anhecer@alumni.uv.es (A.H.-C.); abama4@alumni.uv.es (M.A.-B.); jose.t.real@uv.es (J.T.R.); sergio.martinez@uv.es (S.M.-H.)

² Endocrinology and Nutrition Service, Clinic Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain

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

⁴ CIBERDEM (Diabetes and Associated Metabolic Diseases), 28029 Madrid, Spain; dburks@cipf.es

⁵ CIPF Principe Felipe Research Center, 46012 Valencia, Spain

* Correspondence: herminia.gonzalez@uv.es; Tel.: +34-96-386-4403

Received: 1 October 2020; Accepted: 1 December 2020; Published: 3 December 2020



Abstract: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) increases morbimortality in humans via enhanced susceptibility to cardiovascular disease (CVD). Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors (SGLT2i) are drugs designed for T2DM treatment to diminish hyperglycaemia by reducing up to 90% of renal tube glucose reabsorption. Clinical studies also suggest a beneficial action of SGLT2i in heart failure and CVD independent of its hypoglycaemic effect. In the present study, we explored the effect of SGLT2i dapagliflozin (DAPA) in the metabolism and atherosclerosis in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, which display accelerated atherosclerosis induced by insulin resistance. DAPA treatment of *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, which were fed a high-fat, high-cholesterol diet, failed to modify body weight, plasma glucose or lipid. Carbohydrate metabolism characterisation showed no effect of DAPA in the glucose tolerance test (GTT) despite augmented insulin levels during the test. In fact, decreased C-peptide levels in DAPA-treated mice during the GTT suggested impaired insulin release. Consistent with this, DAPA treatment of *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} isolated islets displayed lower glucose-stimulated insulin secretion compared with vehicle-treated islets. Moreover, insulin-signalling experiments showed decreased pAKT activation in DAPA-treated adipose tissue indicating impaired insulin signalling in this tissue. No changes were seen in lesion size, vulnerability or content of macrophages, vascular smooth muscle cells, T cells or collagen. DAPA did not affect circulating inflammatory cells or cytokine levels. Hence, this study indicates that DAPA does not protect against atherosclerosis in insulin-resistant mice in hypercholesterolemic conditions.

Keywords: type 2 diabetes; SGLT2i; glucose metabolism; insulin resistance; atherosclerosis

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) produces a high morbidity and mortality rate worldwide, mostly by increasing the risk of cardiovascular disease (CVD) [1,2]. CVD is caused by complications of atherosclerosis, a chronic inflammatory disease. Atheroma lesions stem from dysfunction in the endothelial layer that facilitates the accumulation of lipoproteins and immune cells in the subendothelial space of vascular vessel walls. These incipient atheroma plaques can progress to different-stage lesions, a process that is modulated by the adaptive and innate immune system. The later stages of atherosclerosis are characterised by an unbalanced interplay of immune cells that leads to an

unresolved inflammatory process. Excessive inflammation and cellular death events generate clinically critical unstable plaques prone to rupture and can precipitate acute thromboembolic events [3].

Insulin resistance (IR), a primary characteristic of T2DM that may develop up to ten years before disease onset, triggers a series of mechanisms in several vascular cell types that accelerate unstable plaque formation [2]. Consequently, treatments with drugs that restore cellular and tissular insulin sensitivity could potentially reduce CVD complications in T2DM [4]. In support of this, clinical trials designed to examine the safety of newly designed T2DM drugs on heart failure (HF) and CVD have underlined the pleiotropic actions of several anti-diabetic agents [4,5]. Specifically, various investigations have shown that sodium–glucose co-transporter 2 inhibitors (SGLT2i) have beneficial mechanisms against HF and CVD [6]. In this sense, peritoneal macrophages from diabetic *Apoe*^{−/−} and *db/db* mice treated with SGLT2i displayed lower foam cell formation through reduced expression of lectin-like ox-LDL receptor-1 (Lox-1), acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) [7]. SGLT2i alleviate endothelial and vascular smooth muscle cell (VSMC) dysfunction [8]. In diabetic *Apoe*^{−/−} mice, inflammatory mediators VCAM, Mcp1 and NFκB were reduced by dapagliflozin treatment [9], empagliflozin lowered TNFα and IL6 levels [10], and canagliflozin decreased expression of VCAM and Mcp1 [11]. On the other hand, cardiomyofibroblasts from *ob/ob* mice treated with DAPA showed decreased Nlrp3 inflammasome and inflammatory mediators by an AMPK-dependent mechanism independent of the glucose-lowering effect through SGLT2 [12].

Under normal conditions, apical SGLT2, located in the epithelial cells of the proximal renal tubes, reabsorbs glucose and sodium which enter into the blood through basal GLUT2 transporter [13,14]. Hence, selective inhibition of SGLT2 improves T2DM by reducing glucose and sodium reabsorption by up to 90%. The main consequence of this process is that the glucose and sodium are excreted into the urine, with unique hypoglycaemic and natriuretic effects [6,14]. Nonetheless, human clinical trials have demonstrated that SGLT2i reduces body weight, blood pressure, arterial stiffness, visceral adiposity and albuminuria independently by its glucose-lowering effect [5,6]. Treatment of T2DM patients with empagliflozin added to standard drug treatment diminished incidence of CV outcomes and deaths in the EMPA-REG study [15]. Similarly, the CANVAS clinical trial, which analysed T2DM patients with chronic kidney disease treated with canagliflozin, reported a significant decrease in CVD events and kidney failure [16,17]. In line with these clinical trials, in the DECLARE–TIMI 58 trial, dapagliflozin treatment reduced the rate of hospitalisation for heart failure and of death by CVD [18]. These studies point towards safe use of SGLT2i to prevent HF, not only in T2DM but also in subjects without T2DM that have shown positive results [5,19].

In the present study, we investigated the potential benefit of a selective SGLT2i, dapagliflozin (DAPA), in atherosclerosis in *Apoe*^{−/−}*Irs2*^{+/-} mice. This is a mouse model that, under atherogenic dietary conditions, displays IR and accelerated atherosclerosis but not hyperglycaemia or hypertension, hence a highly suitable model to evaluate the impact of the drug on atherosclerosis independently from its unique hypoglycaemic and natriuretic effects.

2. Results

2.1. Metabolic Characterisation of *Apoe*^{−/−}*Irs2*^{+/-} Mice Treated with DAPA or Vehicle

As expected, there was a significant increase in body weight (BW) in vehicle- and dapagliflozin(DAPA)-treated *Apoe*^{−/−}*Irs2*^{+/-} mice after receiving the atherogenic diet (Figure 1a) both in females and males. No differences were observed in BW between DAPA- and vehicle-treated mice. Similarly, fasting glucose levels remained unchanged between vehicle- and DAPA-treated male and female *Apoe*^{−/−}*Irs2*^{+/-} mice (Figure 1b). Fasting insulin levels were diminished in female DAPA-treated *Apoe*^{−/−}*Irs2*^{+/-} mice (Figure 1c, right panel) compared with vehicle-treated female controls. No changes were observed in male mice (Figure 1c, left panel). DAPA-treatment of *Apoe*^{−/−}*Irs2*^{+/-} mice did not alter fasting plasma levels of total-, apoB- and HDL-cholesterol or triacylglycerol (Figure 1d–g).

Hepatic analysis also revealed no effect of DAPA-treatment on triacylglycerol content in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice (Figure S1a,b, see section on supplementary data given at the end of this article) and absence of hepatic lipid droplets (Figure S1c).

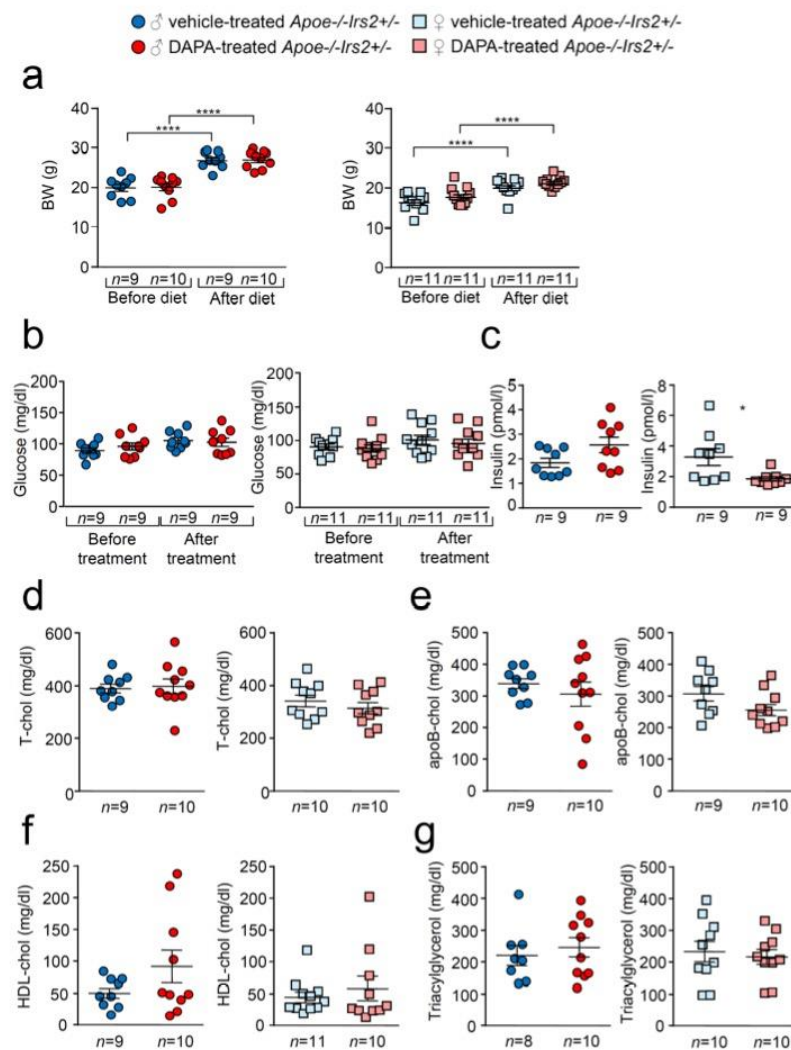


Figure 1. Effect of DAPA treatment in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. (a) Body weight (BW) before and after atherogenic diet in male (left panel) and female (right panel) vehicle-treated and DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. (b) Fasting plasma glucose levels in male (left panel) and female (right panel) vehicle-treated and DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. (c) Fasting insulin levels in male (left panel) and female (right panel) vehicle- and DAPA-treated mice after treatment. (d) Total-cholesterol, (e) apoB-cholesterol, (f) HDL-cholesterol and (g) triacylglycerol levels in male (left panel) and female (right panel) DAPA- and vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. Data are represented as individual points with mean \pm sem. The statistical analysis for normal distribution was D’Agostino–Pearson and for differences was two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post-hoc test (a,b), Student’s *t*-test (c,f, left panel), (d,e) and (g, right panel), and Mann–Whitney U test (c,f, right panel) and (g, left panel). **** $p < 0.0001$. * $p < 0.05$.

Next, we performed a more detailed characterisation of carbohydrate metabolism. Glucose tolerance measured as the area under the curve (AUC_{glucose}) parameter of the GTT was similar in both vehicle and DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice in both sexes (Figure 2a,b, right panels). The insulin release during the GTT, determined as AUC_{insulin} at 120 min, was also indistinguishable between vehicle- and DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} male and female mice (Figure 2c,d, right panels). Insulin release at 30 min, AUC_{insulin} 30 min (Figure 2c, middle panel) was higher in DAPA-treated male mice compared with vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} male controls. Moreover, C-peptide levels were reduced in DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice (Figure 2e, left panel) measured as $AUC_{\text{C-peptide}}$ at 120 min (Figure 2e right panel) indicating that the insulin increase was due to impaired clearance rather than higher pancreatic secretion. Consistent with this, glucose stimulated insulin secretion assay, in isolated islets from *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, demonstrated diminished insulin secretion index in DAPA-treated islets (Figure 2f) compared with vehicle-treated islet controls. Thus, these results suggest that DAPA impairs insulin action in sensitive tissues and insulin secretion by islets.

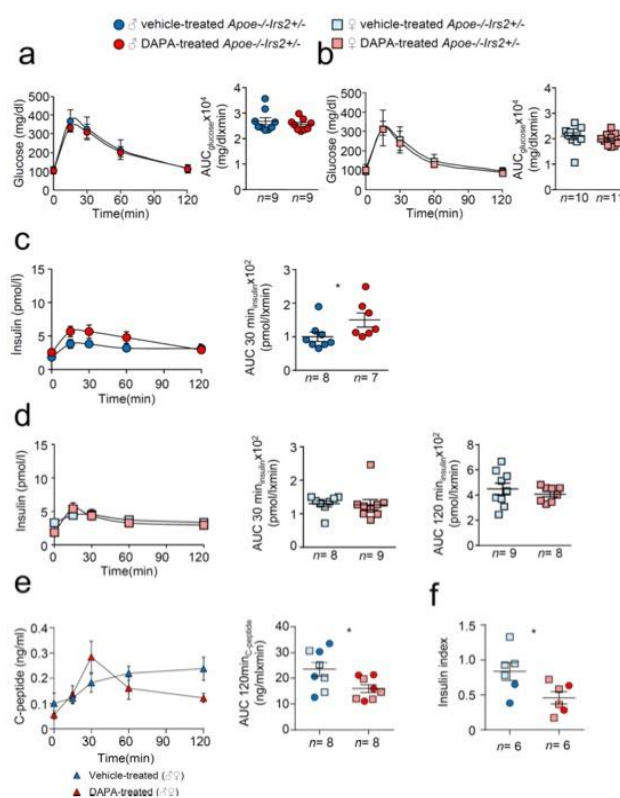


Figure 2. Metabolic characterisation of vehicle-treated and DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. Glucose levels during the glucose tolerance test (GTT) and the area under the curve (AUC_{glucose}) generated from the glucose curve during the test for male (a) and female (b) vehicle- and DAPA-treated mice. Plasmatic insulin levels stimulated by the glucose infusion during the GTT and the AUC_{insulin} calculated at 30 and 120 min of the test for (c) male and (d) female vehicle- and DAPA-treated mice. (e) C-peptide levels during the insulin tolerance test (ITT) and the corresponding $AUC_{\text{C-peptide}}$ in 4-hour-fasted mice. (f) Insulin secretion index obtained from the glucose-stimulated insulin secretion assay in isolated islets from *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice treated with DAPA or vehicle. The statistical analysis for normal distribution was D'Agostino–Pearson (a–f) and Kolmogorov–Smirnov test (f) and for differences Student's *t*-test (d, right panel) and (e,f) and Mann–Whitney U test (a–d, left panel) (a–c) and (d, left panel). * $p < 0.05$.

To better analyse insulin action in DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, insulin sensitivity and signalling were explored. Insulin sensitivity assessed by the insulin tolerance test (ITT) and measured by the AUC_{glucose} revealed no effect of DAPA in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice neither in males (Figure 3a) or in females (Figure 3b). However, analysis of the insulin-signalling pathway activation in vitro showed decreased pAKT/AKT protein ratio levels in DAPA-treated adipose tissue explants (Figure 3c).

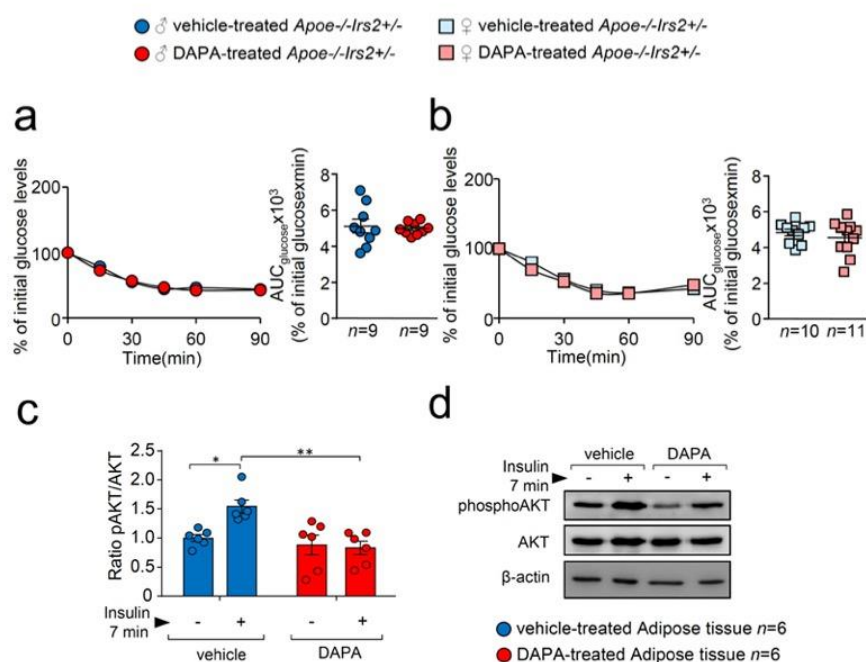


Figure 3. DAPA treatment effect on insulin sensitivity and signalling pathway. Glucose levels during the ITT and the corresponding AUC_{glucose} in 4-hour-fasted (a) male and (b) female *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. (c) Quantification of phosphorylated(activated)-AKT1/2 (pAKT1/2)/AKT1/2 ratios in insulin-stimulated adipose tissue explants pretreated with vehicle or DAPA 1 μM. β-actin is shown as a sample loading control. Phosphorylated forms were normalised to total protein levels and were relativised to the unstimulated sample. (d) Representative blots are depicted on the right of the quantification. Statistical analysis tests for normal distribution were the D’Agostino–Pearson omnibus (a,b) and Kolmogorov–Smirnov test (c) and for differences, the Student’s *t*-test (a,b) and two-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test (c). * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01.

These results indicate that DAPA does not have a beneficial effect on carbohydrate metabolism in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice and might even exert detrimental effects on insulin signalling and insulin secretion in certain conditions.

2.2. DAPA Treatment in Atherogenic Diet-Fed *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} Mice Does Not Affect Atherosclerosis Lesion Size or Plaque Stability

En face atheroma lesion size determination in whole-mounted aortas showed no effect of DAPA-treatment in aortic arches or thoracic aortas of *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice compared with vehicle-treated controls regardless of sex (Figure 4a–e). Atherosclerosis development determinations in cross-sections revealed similar sizes in male and female DAPA- and vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice in the three regions analysed, aortic root (Figure 4f–h), ascending aorta (Figure 4i–k), and aorta (Figure 4l–n).

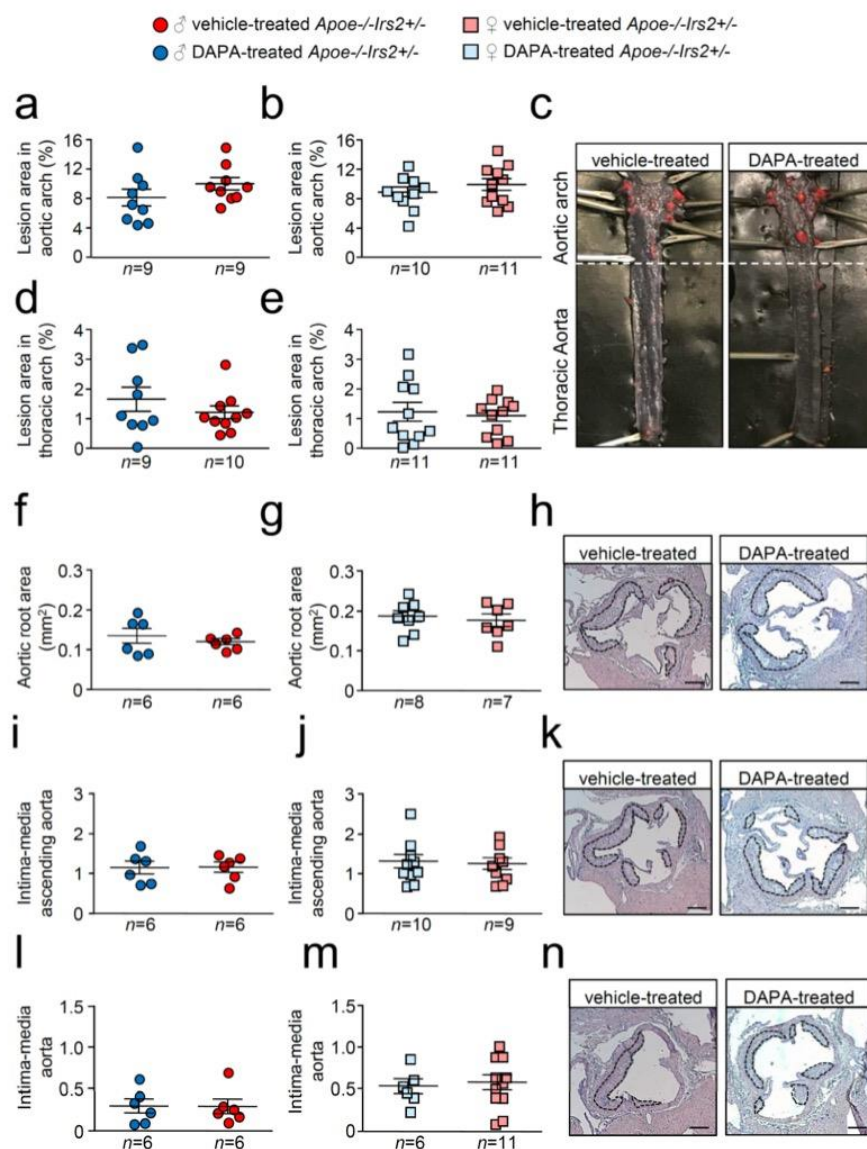


Figure 4. Atherosclerotic lesion size analysis in vehicle- and DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. Atherosclerosis analysis in (a,b) the aortic arch and (d,e) the thoracic aorta of whole-mounted oil-red-O-stained aortas from both vehicle- and DAPA-treated male and female mice. Lesion size determinations in cross-sections of (f,g) the aortic root, in (i,j) the ascending aorta, and in (l,m) the aorta displayed as absolute area (f,g) and as an intima-media ratio (i,j,l,m). (c) Representative photographs of whole-mounted aortas. Magnification 0.17. Representative images of haematoxylin/eosin-stained cross-sections of the aortic root (h), ascending aorta (k) and aorta (n). The limits of the lesion are indicated by the dashed lines. Scale bar: 200 μ m. The statistical analysis for normality was D'Agostino–Pearson omnibus test and for differences was the Student's *t*-test (a,b,d,j) and the Mann–Whitney U test (e–g,i,l,m).

Further analysis of the atheroma cellular composition and parameters of plaque stability was next performed. Macrophage, vascular smooth muscle cells (VSMCs), and T lymphocyte absolute and relative contents were undistinguishable between male and female DAPA- and vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice (Figure 5a–i).

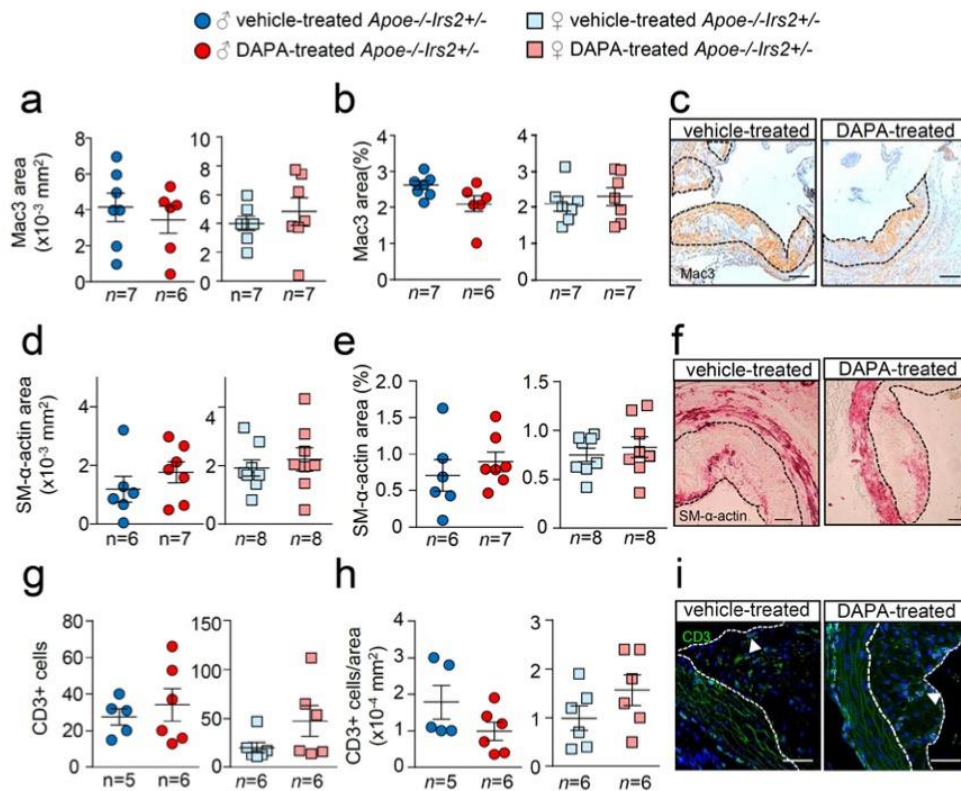


Figure 5. Effect of DAPA in atheroma plaque characteristics of *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. (a,b) Macrophage and (d,e) vascular smooth muscle cell (VSMC) content in aortic cross-sections from vehicle- and DAPA-treated male (left panels) and female mice (right panels), determined as Mac3⁺ and SM- α -actin⁺ areas measured as absolute area (in mm²) (a,d) and as percentage of the positive-stained area relative to lesion area (b,e). Scale bar: 100 μ m. Number of T lymphocytes in lesions of aortic cross-sections detected as CD3⁺ cells and depicted as (g) absolute cell number and as (h) cell number relative to lesion area (in mm²) in both sexes from vehicle- and DAPA-treated mice. Scale bar: 50 μ m. Photomicrographs next to the quantifications (c,f,i) show representative images of the immunostainings. White arrows in (i) point to CD3⁺ cells. The limits of the lesion are indicated by the dashed lines. The statistical analysis for normal distribution was the D’Agostino–Pearson omnibus test (d,e) and Kormokov–Smirnov was performed using Student’s *t*-test (d,e, right panels) and Mann–Whitney U test (a,b,g,h) and (d,e, left panels).

Similarly, examination of collagen content, necrotic core area, fibrous cap thickness and elastic fibre’s area failed to show differences between treatments (Figure 6a–f). Thus, DAPA treatment in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice on a 2-month atherogenic diet does not influence atherosclerosis development or plaque stability parameters.

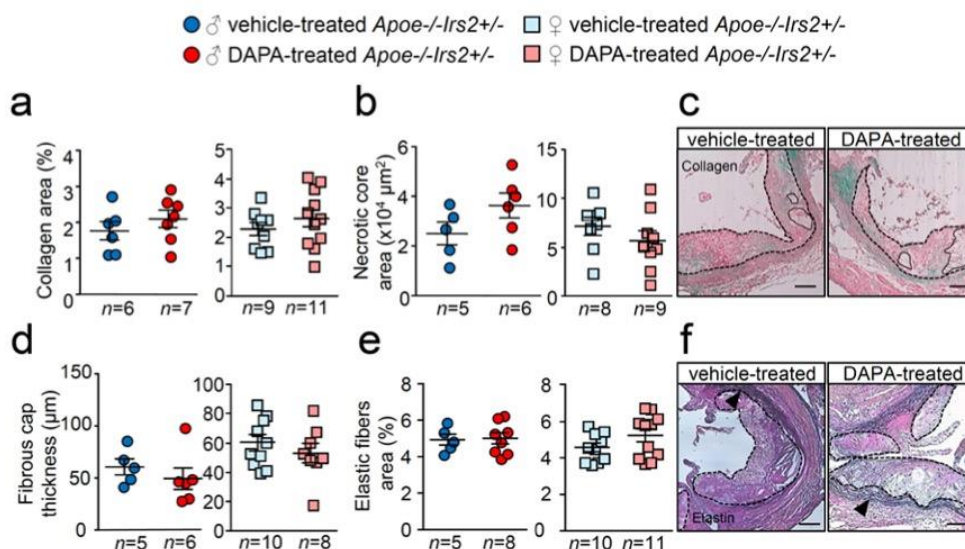


Figure 6. Effect of DAPA in atheroma plaque characteristics of *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. (a) Collagen content (in percentage), (b) necrotic core area (in μm²) and (d) fibrous cap thickness (in μm) determined in Masson trichrome stained lesions from vehicle- and DAPA-treated male (left panels) and female (right panels) mice. (e) Elastin fibres' area assessed in Verhoeff-Van Gieson cross-sections and displayed as percentage of area relative to lesion area in male and female mice. Representative images of Masson trichrome (c,f) Verhoeff-Van Gieson stainings. Black arrows in (f) point to elastic fibre's breaks in the media. The dashed lines delineate the limits of the lesion and solid lines delineate the limits of representative necrotic cores. Scale bar: 100 μm. The statistical analysis for normal distribution was Kolmogorov–Smirnov test and for differences was the Student's *t*-test (a,b,d,e, right panels) and Mann–Whitney U test (a,b,d,e, left panels).

2.3. DAPA Treatment Effect in Inflammation in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} Mice Fed an Atherogenic Diet

Some investigations have suggested a role for gliflozins in inflammation and in heart failure through monocyte/macrophage polarisation and, in light of this, inflammatory parameters were studied.

Compared with vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, DAPA-treated mice did not show differences in the circulating plasma levels of MCP1 or TNFα (Figure 7a,b). Analysis of circulating leukocytes showed similar percentages of lymphocytes, monocytes, and neutrophils between DAPA- and vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} male and female mice (Figure 7c,d). Monocyte subpopulations analysis did not detect changes in the proinvasive and proinflammatory Ly6C^{hi} subsets or in the pro-resolving Ly6C^{low} monocyte subpopulations in DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice compared with vehicle-treated controls (Figure 7e,f).

Likewise, T CD3+ CD4+ and CD8+ lymphocytes populations (Figure S2a,d,g) and their activated subpopulations CD3+CD69+, CD4+CD69+ and CD8+CD69+ (Figure S2b,e,h) remained unchanged. Circulating CD4+CD25+Foxp3+ Treg cell analysis showed also similar levels in DAPA- and vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice (Figure S2j).

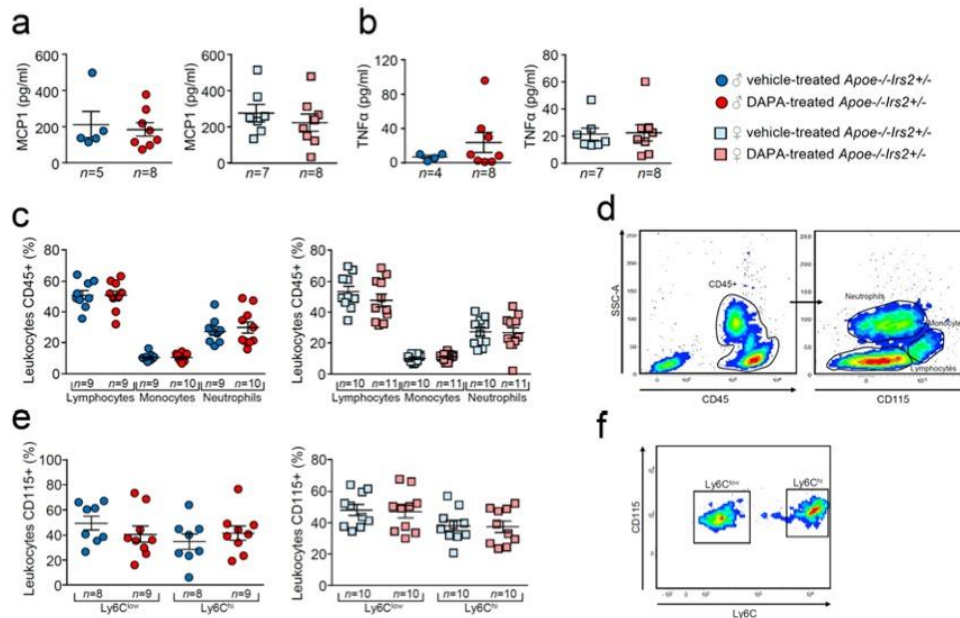


Figure 7. Effect of dapagliflozin in inflammatory mediators and cells in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice. Circulating plasma levels of (a) MCP1 and (b) TNFα proinflammatory cytokines. (c) Circulating levels (in percentage) of lymphocytes, monocytes and neutrophils in the CD45⁺ population, identified by morphology and CD115 monocyte marker. (d) Representative cytometry plots of the gating strategy used for the flow cytometry analysis in the different leukocyte populations. (e) Circulating levels of monocyte subpopulations (in percentage) identified as CD45⁺CD115⁺Ly6C^{low} pro-resolving and as CD45⁺CD115⁺Ly6C^{hi} invasive monocyte subsets in male and female mouse blood. (f) Representative cytometry plots of the gating strategy used for monocyte subsets in blood samples. The statistical analyses for normal distribution were Kolmogorov–Smirnov test (a,b) and D’Agostino–Pearson test (c,e) and for differences were Mann–Whitney U test (a,b) and Student’s *t*-test (c,e).

2.4. Effect of DAPA in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} Mouse Macrophages

A recent investigation has shown that DAPA attenuates myocardial infarction through macrophage phenotype modulation [20], therefore, the effects of DAPA and DAPA conditioned media (DAPACM) and their respective vehicle controls were evaluated in vitro *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} murine-derived macrophages.

Cytokine expression analysis revealed diminished mRNA levels of *Mcp1* in DAPA-treated (Figure 8a) macrophages compared with vehicle-treated cells without changes in *Tnfa* (Figure 8b) or *Il6* (Figure 8c) expression. Consistent with the in vivo data, cytokine gene expression in macrophages was not altered by the treatment with media containing DAPA-treated mouse plasma, DAPACM, compared with that in macrophages treated with vehicleCM derived from vehicle-treated mice (Figure 8a–c). Analysis of surface macrophage markers showed no differences in the activation marker *Cd11c* among treatments (Figure S3a). DAPA-treated macrophages displayed diminished expression of the *Cd206* macrophage marker compared with controls (Figure S3b) but remained unchanged between DAPACM and vehicleCM treatments (Figure S3b). Consistent with the results in macrophages treated with conditioned media, the content of macrophage markers iNOS and ARG1 in atheroma lesions was similar between DAPA- and vehicle-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice (Figure 8d,e).

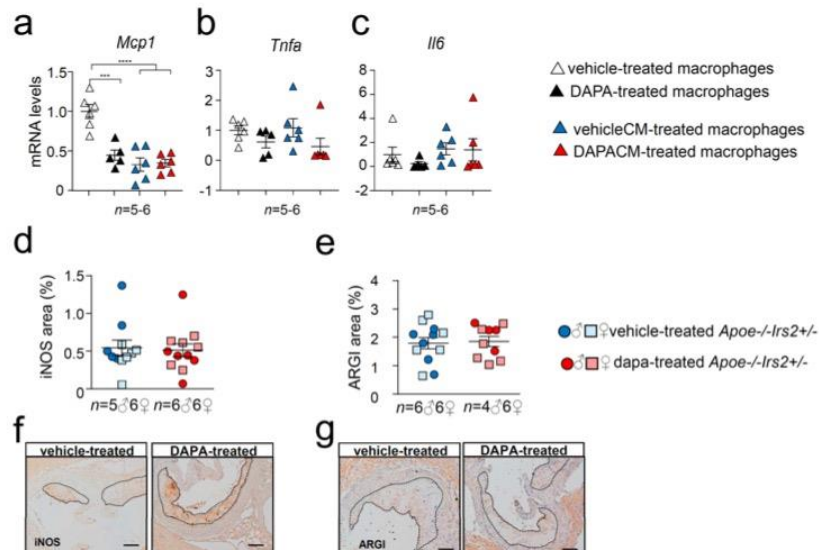


Figure 8. Effect of DAPA in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mouse macrophage phenotype. mRNA expression of proinflammatory (a) *Mcp1*, (b) *Tnfa* and (c) *Il6* cytokines in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} macrophages treated with vehicle (vehicle-treated), 1 μM of DAPA (DAPA-treated) or with conditioned media containing 10% of plasma from vehicle-treated mice (vehicleCM) or with conditioned media containing 10% of plasma from DAPA-treated mice (DAPACM). (d) iNOS and (e) ARG1 lesional content in aortic cross-sections from vehicle- and DAPA-treated male and female mice, determined as percentage of positive stained area relative to lesion area. Representative images of the (f) iNOS, and (g) ARG1, stainings used for the quantifications are shown. Scale bar: 100 μm. The lesion is limited by dashed lines. The statistical analysis for normal distribution was Kolmogorov–Smirnov test and for differences was one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test (panel a), Kruskal–Wallis followed by Dunn’s multiple comparison test (panels b,c) and Mann–Whitney U test (panels d,e). *** *p* < 0.001; **** *p* < 0.0001.

3. Discussion

T2DM is a major risk factor for developing atherosclerosis, the main cause of CVD. Human clinical trials have shown that anti-diabetic drug SGLT2i protects against CVD and HF in T2DM beyond its glucose-lowering effects. Several anti-diabetic agents control atherosclerosis development by restoring the homeostasis altered by IR in atheroma lesional cells, a key feature of T2DM. Therefore, in the present study we evaluated the potential of SGLT2i DAPA in restraining atherosclerosis in IR conditions. To this end, we investigated the effect of DAPA on *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, which, under cholesterol-enriched atherogenic diet conditions, display accelerated atherosclerosis, IR and hypercholesterolemia. Treatment of *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice with DAPA did not result in changes in BW or fasting plasma glucose compared with vehicle-treated controls. Fasting insulin was increased in DAPA-treated females but not in males. Similarly, no differences in the levels of cholesterol (total, apoB- and HDL-cholesterol) or triacylglycerol were observed between vehicle- and DAPA-treated mice. Carbohydrate metabolism characterisation revealed no effect of DAPA on glucose tolerance or insulin sensitivity tests. Notwithstanding this, analysis of insulin release during the GTT demonstrated increased insulin levels but lower C-peptide release in DAPA-treated *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice indicating abnormal insulin clearance. Further analysis showed impaired insulin secretion of isolated pancreatic islets treated with DAPA. In addition, impaired insulin signalling in adipose tissue explants pretreated with DAPA was observed suggesting a detrimental effect on insulin action in this tissue. Atherosclerosis lesion determinations in whole-mounted aorta and heart cross-sections did not show differences

between vehicle and DAPA-treated mice. No effect of DAPA was observed in cellular and collagen contents or in plaque vulnerability parameters within atheroma lesions. Likewise, DAPA did not affect circulating immune system cells or plasmatic cytokine levels in vivo, although in macrophages resulted in a decrease in *Mcp1* and *Cd206* expression compared to vehicle-treated macrophages. Altogether this indicates that DAPA treatment in vivo does not protect against atherosclerosis in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice and it seems to interfere with islet insulin secretion and adipose tissue insulin-signalling. These data suggest that DAPA might not be effective against atherosclerotic complications associated with IR or prediabetic states.

SGLT2i has been widely demonstrated to exert protective effects in metabolism by reducing plasmatic hyperglycaemia and increasing glucosuria and natriuresis. Weight loss due to urinary loss of calories, improved renal function and blood pressure are direct consequences of SGLT2i [21,22]. Moreover, in T2DM subjects, empagliflozin treatment improved insulin β cell function and insulin sensitivity [23] while DAPA only ameliorated muscle insulin sensitivity [24]. In our study, with a mouse model exhibiting IR but no other T2DM features, which also had hyperlipidaemia due to a high-fat, high-cholesterol diet, DAPA treatment during the glucose challenge did not change glucose levels, despite increased insulin plasmatic concentration. Blood insulin levels are determined by pancreatic islet secretion but also by its plasmatic clearance. In fact, the observed decreased C-peptide release suggested impaired insulin secretion from pancreatic islets. Consistent with the latter, isolated pancreatic islets from *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice treated with DAPA exhibited diminished insulin secretion index. Hence, the defective blood glucose lowering effect of the circulating insulin in DAPA-treated mice indicated otherwise defective clearance. Of note, defective insulin clearance and degradation are observed in subjects with T2DM frequently due to abnormal insulin–insulin receptor (INSR) internalisation and recycling in insulin-sensitive tissues, including liver, skeletal muscle, adipose tissue and kidney [25,26]. Consistent with defective INSR downstream signalling, experiments in adipose tissue demonstrated impaired insulin-pathway activation, shown by a reduction in phosphoAKT protein levels. Our results suggest that DAPA might affect metabolism by interfering with insulin-signalling in adipose tissue. Notwithstanding, given that the major contributors to insulin clearance are hepatic and skeletal muscle, further research must be conducted to demonstrate the hypothesis. Altogether, our study suggests that DAPA treatment in IR mice in hyperlipidaemic conditions might have limited effects.

In addition, DAPA did not alter atherosclerosis or inflammatory parameters in our mouse model. Preclinical investigations have shown that DAPA does not act on atherosclerosis in *Apoe*^{-/-} mice, but significantly diminished lesion size in hyperglycaemic conditions without IR. Thus DAPA decreased atheroma size in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycaemic and diabetic *Apoe*^{-/-} mice through reduction in hyperglycaemia-induced foam cell formation [7]. On the other hand, empagliflozin treatment decreased atheroma plaques of *Apoe*^{-/-} mice fed a carbohydrate- (43%) and fat- (41%) rich Western diet [10]. Although the authors suggested that IR improvement was the precipitant of atherosclerosis reduction, empagliflozin treatment also decreased carbohydrate-induced hyperglycaemia, which could help mitigate atherosclerosis development. In agreement with this, DAPA reduced atherosclerosis in STZ-induced diabetic *Ldlr*^{-/-} [27] and *Apoe*^{-/-} [28] mice. Consistent with these studies, empagliflozin [29] and canagliflozin [30] ameliorated endothelial dysfunction and atheroma lesion development in STZ-induced diabetic *Apoe*^{-/-} mice. Empagliflozin also facilitated regression of atherosclerosis in STZ-induced hyperglycaemic mice whose atherosclerosis was induced by *Ldlr*^{-/-} and *Srb1*^{-/-} antisense oligonucleotide injection [31]. Altogether, these studies cast doubt on the beneficial actions of SGLT2i in the absence of hyperglycaemia and suggest that anti-atherogenic effects are exerted by decreasing glucose levels independently of insulin action.

Among SGLT2i mechanisms [32], polarisation towards a non-invasive and pro-resolving phenotype of macrophages via increased signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity-dependent mechanism has been reported [20]. Notably, we have previously demonstrated that glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R) agonists decrease plaque size and vulnerability in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice by inducing a protective circulating immune cell phenotype, and by inducing

polarisation of lesional macrophage to an anti-inflammatory phenotype [33]. Studies in the present investigation showed that in vitro treatment of macrophages with DAPA reduced expression of proinflammatory *Mcp1* cytokine and macrophage marker *Cd206*. However, here DAPA did not show an in vivo impact on either circulating immune cells or lesional macrophage content or markers (iNOS and ARG1). Therefore, our results show that although DAPA might have potential beneficial effects on macrophages in vitro, these are irrelevant for in vivo macrophage phenotype modulation and for atherosclerosis development in our experimental setting, characterised by the absence of hyperglycaemia.

In summary, our study indicates that DAPA treatment fails to alter glucose levels or atherosclerosis development in *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice, which develop hypercholesterolemia and IR but not hyperglycaemia. Moreover, DAPA reduced glucose-stimulated insulin secretion from islets, insulin clearance in vivo and insulin-signalling in adipose tissue. The present investigation suggests that DAPA might not exert beneficial effects in atheroma vascular disease in IR and hypercholesterolemic conditions.

4. Materials and Methods

4.1. Mice, Diets and Drug Treatments

Apoe^{-/-} and *Irs2*^{+/-} mice were crossed to generate *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice (C57BL/6J) background, $n = 21$ male and $n = 22$ female). Mice had free access to water, were under temperature and humidity-controlled conditions (22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$) and with 12h light–dark cycles (8:00–20:00 h) in a conventional animal facility. Mice were maintained on a regular chow diet (Teklad Global Rodent Diets 6.5% fat; Tekland, Envigo, Barcelona, Spain) and at 8 weeks of age were placed on an atherogenic diet (10.8% fat, 0.75% cholesterol, S4892-E010, Ssniff, Soest, Germany) which is a Paigen-based diet with modifications as described before [34] for 8 weeks. For the last 6 weeks, mice were randomly assigned to receive daily treatment with dapagliflozin ($n = 11$ female $n = 11$ male; p.o. 3 mg/kg/day in 120 μ L) or with vehicle [35] (carboxymethyl cellulose) ($n = 10$ female $n = 11$ male). Dose, timing of treatment, route of administration and drug concentration for delivery was based on previous investigations [33,35]. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of INCLIVA and University of Valencia (5/25/2017, procedure A1484231073016, administration approval 2017/VSC/PEA/00081) and complied with the 2010/63/EU European Parliament directive.

4.2. Plasmatic Biochemical Determinations and Metabolic Assays

Plasma was obtained from whole blood with ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) of overnight-fasted mice. Analysis included triacylglycerol, total cholesterol, apoB-cholesterol, HDL-cholesterol (Wako Diagnostics, Mountain View, CA, USA) as previously described [36]. Glucose tolerance tests (GTTs) (2 g/Kg of body weight, BW, of glucose) and insulin tolerance tests (ITTs) (0.5 U/Kg of BW Humulina, Lilly, Alcobendas, Spain) were performed in overnight- and 4-h-fasted mice, respectively. Glucose levels were measured at different time points using a glucometer (Ascensia Elite, Bayer, Leverkusen, Germany). Fasting basal insulin and insulin-release and C-peptide levels during the GTT were measured using an anti-mouse insulin and C-peptide ELISA kit (CrystalChem, Zaandam, The Netherlands) as reported [36].

4.3. Pancreatic Islet Isolation and Glucose-Stimulated Insulin Secretion Assay

For islet isolation, *Apoe*^{-/-}*Irs2*^{+/-} mice were infused with Krebs buffer (127 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 24 mM NaHCO₃, 6 mM Hepes, 2 mg/mL glucose, 0.1% albumin, equilibrated with 5% CO₂ in O₂) and the pancreas was dissected and digested with collagenase-NB8 (1 mg/mL, Serva, Heidelberg, Germany) at 37 °C in a shaking water bath for 20 min. Islets were handpicked under stereoscope as described [37]. Insulin secretion was evaluated by a glucose-stimulated insulin secretion assay at low (2.8 mmol/L) and high (16.7 mmol/L) glucose

concentrations in KRBH buffer (140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Hepes, 2 mg/mL glucose, 0.1% albumin). Four assays (5 islets each) were performed per condition and insulin concentrations were measured by ELISA. The glucose stimulated insulin secretion index was calculated as the ratio between high glucose-stimulated insulin release and the low glucose-stimulated insulin secretion normalised each by the insulin content of the islets.

4.4. Liver Triacylglycerol Content and Histochemical Staining

Triacylglycerol hepatic content was determined by tissue digestion and saponification in ethanolic potassium hydroxide, followed by enzymatic measurement of glycerol content (Free Glycerol Reagent, Sigma, St. Louis, MO, USA). For examination of lipid droplets in hepatic tissue, paraffin-embedded tissue sections were stained with haematoxylin–eosin and analysed as described [36].

4.5. Insulin Signalling Experiments in Adipose Tissue and Protein Analysis by Western Blot

Epididymal visceral fat pads from *Irs2*^{+/-} mice were minced into 2–3 mm³ and incubated 24 h at 100 mg/mL in 6 well-plates with DMEM-P/S/A-10%FBS media in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Explants were washed with PBS1X twice and incubated with DMEM-P/S/A-0.1%FBS media for 24 h in the presence of DAPA 1 μM or media with vehicle as control adipose tissue. Explants were then stimulated 7 min with insulin (200 nM, Sigma, St. Louis, MO, USA) or vehicle and then snap-frozen in liquid N₂ for insulin-signalling pathway analysis by Western blot as described [38]. Briefly, protein extracts were obtained by homogenising adipose tissue in the presence of ice-cold fat lysis buffer (Hepes 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton 1% vol/vol, glycerol 10% vol/vol) supplemented with Complete Mini cocktail, PhosSTOP (Roche, Mannheim, Germany), beta-glycerophosphate 50 mM (Sigma), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Roche) and 200 μM Na₃VO₄ (Sigma). Protein extracts (50 μg) were prepared with Laemmli buffer (5 min 95 °C) and subjected to 12% *w/v* polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot as described. The following primary (1/200) and secondary (1/2000) antibodies were used to detect the proteins: pAKT (4058, Cell Signalling, Beverly, MA, USA), AKT1/2 (sc1619, Santa Cruz Biotech Dallas, TX, USA) and β-actin (A5441, Sigma, St. Louis, MO, USA), anti-mouse IgG-HRP (P0447, Dako), donkey anti-goat IgG-HRP (sc2056, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) and goat anti-rabbit IgG-HRP (P0448, Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA). The immunocomplexes were detected with an ECL Plus detection kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). All antibodies for Western blot were acquired and used after checking that validation was performed by manufacturer company.

4.6. Atheroma Lesion Analysis

To quantify atheroma lesion size, aortas and hearts of mice were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde/PBS (vol/vol). Lesion extension was assessed by an *en face* analysis of whole-mounted aortas stained with oil red-O (Sigma) using morphometric analysis (Fiji, ImageJ-win64, NIH, Bethesda, MD, USA). Hearts were paraffin-embedded, sectioned for haematoxylin/eosin staining and analysed for atheroma lesion size measured as lesion area (mm²) in the aortic root and as the intima–media ratio in two regions of the ascending aorta [40].

4.7. Histopathological Characterisation of Atheroma Lesions

Collagen content, necrotic core area, and fibrous cap thickness of atheromas were determined in sections stained with Masson's trichrome staining. Elastic fibres were analysed in aortic cross-sections stained with Verhoeff–Van Gieson staining. For plaque instability, fibrous cap thickness (in μm) and necrotic core area (measured as μm²) were determined. The fibrous caps were defined as regions above the necrotic cores and were later identified as non-stained acellular areas [39]. Macrophages in lesions were detected by immunohistochemistry in cross-sections treated for peroxidase inactivation (H₂O₂ 0.3%) and blocking with horse serum (5%) followed by incubation overnight at 4 °C with an anti-Mac-3 antibody (1/200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and biotin-conjugated

goat anti-rat secondary antibody incubation 1 h at room temperature (1/300, Santa Cruz). For inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase I (ARGI) analysis, aortic cross-sections underwent antigen retrieval (citrate buffer, 10 mM, pH 6.5 high pressure and temperature), peroxidase inactivation (H₂O₂ 3%), blocking with horse serum (5%), incubation overnight at 4 °C with primary antibodies (rabbit anti-MMP-9, 1/200 dilution, (UPSTATE-Millipore, Billerica, MA, USA), anti-iNOS antibody 1/100 dilution (Abcam, Cambridge, UK) and anti-arginase I 1/50 dilution (Sigma, St. Louis, MO, USA)), and incubation with a biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1/500 dilution, Santa Cruz). Immunocomplexes were detected with streptavidin-HRP (ab7403, Abcam, Cambridge, UK) and then developed with DAB substrate. Counterstaining was done with haematoxylin and slides were mounted with EUKITT (Deltalab, Barcelona, Spain). Lesional VSMCs were detected using an anti-SM α -actin monoclonal alkaline phosphatase-conjugated antibody (1/20 dilution, Sigma) and Fast Red substrate (Sigma). Slides were mounted with glycerol gelatin (Sigma) [33]. All images were captured with a Leica DMD108 microscope coupled to a camera (Leica, Wetzlar, Germany). T-lymphocytes in atheromas were detected by immunofluorescence with a polyclonal anti-human CD3 antibody (1/75 dilution, Dako, Santa Clara, CA, USA) and Alexa Fluor[®]-488 anti-rabbit IgG secondary antibody (1/200 dilution, Invitrogen, Madrid, Spain). Slides were mounted with Slow-Fade Gold reagent (Invitrogen) and analysed with an inverted fluorescent microscope (DMI3000B, Leica). All antibodies used were validated using negative controls by omission of primary antibodies.

4.8. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) of Cytokines

Circulating levels of cytokines were determined in isolated plasma from heparinised mouse blood (10U heparin/mL) using the specific cytokine DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

4.9. Circulating Leukocyte Analysis by Flow Cytometry

To characterise circulating leukocytes by flow cytometry, 10 μ L of heparinised whole blood was incubated for 30 min at RT with CD45-FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) to identify leukocytes. Lymphocytes and neutrophils were identified by complexity and morphology, whereas monocytes were gated based on the CD115-APC marker (Biolegend, San Diego, CA, USA). Ly6C-PerCP (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and CD115-APC (Biolegend, San Diego, CA, USA) were used for Ly6C^{low} and Ly6C^{hi}-monocyte subsets identification. For circulating lymphocytes analysis, 10 μ L of heparinised whole blood was incubated with 5 μ L Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) followed by CD4-BV421, CD8a-BV510, CD3e-APC, or CD69-PE antibodies (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Mouse Tregs were identified using Kit FoxP3 Staining Buffer Set and with anti-CD25-APC, anti-Foxp3-PE, and anti-CD4-VioBlue (all from Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). The samples were incubated with FACS Lysing solution (BD Biosciences) for 10 min before flow cytometry analysis (FACSVerse or FACS Fortessa Flow cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

4.10. Experiments with Bone Marrow-Derived Macrophages

Murine bone marrow-derived macrophages were obtained from the femoral and tibial bone marrow of mice sacrificed by cervical dislocation. Bone marrow cells were differentiated for 5–6 days with 10% FBS/DMEM (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% L929-cell conditioned medium (LCM: as a source of macrophage colony-stimulating factor) [40]. For the last 24 h, macrophages were treated with 0.5%FBS/DMEM medium supplemented with vehicle, 1 μ m of DAPA, 10% of plasma from DAPA-treated mice (Dapagliflozin-conditioned media, DAPACM) or 10% of plasma from vehicle-treated mice (vehicle-conditioned media, vehicleCM). Cytokine gene expression was analysed by qPCR.

4.11. Gene Expression Analysis by Quantitative Real-Time PCR

RNA (0.5–1 µg) from murine macrophages was obtained using TRIzol Reagent (Invitrogen), which was reverse-transcribed with the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit and amplified with Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) on a thermal Cycler 7900 FastSystem. Results were analysed with the provided software (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). mRNA levels were normalised to cyclophilin expression and relativised to controls. The primer sequences can be found in Supplementary Data Table S1.

4.12. Statistical Analysis

Quantitative variables are shown as single data points and mean ± sem. All data obtained were analysed unless these data were out of range of the standard curve or if samples were lost during the experimentation. Data were analysed for normal distribution using the D'Agostino–Pearson omnibus, Shapiro–Wilk test or Kolmogorov–Smirnov test. Differences were evaluated with the Student's *t*-test, Mann–Whitney U test, two-way ANOVA followed by Bonferroni or Tukey's post hoc test, one-way ANOVA followed by Bonferroni or Tukey's multiple comparison test (more than two groups), or Kruskal–Wallis followed by Dunn's multiple comparison test (more than two groups) (GraphPadPrism Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Male and female data were displayed separately.

5. Conclusions

Altogether, our study indicates that in mice with IR but without hyperglycaemia or other characteristics of T2DM, DAPA treatment does not restrain atherosclerosis, and could have detrimental effects.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9216/s1>.

Author Contributions: A.T.-C. acquired and analysed the in vivo data, participated in the interpretation of results and helped to write the manuscript. A.H.-C. and M.A.-B. performed, islets, insulin-signalling, flow cytometry and macrophage experiments, interpreted the data and helped in the writing of the manuscript. Á.V. acquired in vivo data and critically revised the manuscript. D.J.B., S.M.-H. and J.T.R. participated in the study design and critically revised the manuscript. H.G.-N. conceived and designed the study, supervised data acquisition, interpreted the results, and wrote the manuscript. H.G.-N. is the guarantor of this work. All authors approved the final version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Carlos III Health Institute, grant numbers PI16/00091 to H.G.-N. and PI19/00169 to H.G.-N. and S.M.-H. and the European Regional Development Fund (FEDER). H.G.-N. was an investigator in the Miguel Servet program from Carlos III Health Institute, grant number CP16/0013, and GenT Investigator of Excellence from Generalitat Valenciana, grant number CDEI-04-20-B. S.M.-H. is an investigator from the “Juan Rodes” program from Carlos III Health Institute, grant number JR18/00051. Á.V. received salary support from Proyecto Paula and A.H.-C. from Generalitat Valenciana, grant number APOTIP/2018/021. This work was also supported by CIBERDEM, grant number CB07/08/0043, a Carlos III Health Institute initiative.

Acknowledgments: We thank G. Herrera (INCLIVA, Spain) for assistance with the flow cytometry, A. Díaz (University of Valencia, Spain) for animal care and P. Rentero and S. Blesa for help with expression studies and analysis (INCLIVA, Spain). We also thank G. Hurtado for help with immunohistochemistry (University of Valencia, Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ApoE	apolipoprotein E
ARG	arginase I
AUC	area under the curve
BW	body weight
CVD	cardiovascular disease
DAPA	dapagliflozin
EDTA	ethylenediaminetetra-acetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GTT	glucose tolerance test
HF	heart failure
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IR	insulin resistance
IRS2	insulin receptor substrate 2
ITT	insulin tolerance test
MMP9	matrix metalloproteinase 9
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
SGLT2	sodium-glucose transporter 2
SGLT2i	sodium-glucose transporter 2 inhibitor
STAT	signal transducer and activator of transcription
STZ	streptozotocin
T2DM	type 2 diabetes mellitus
VSMC	vascular smooth muscle cells

References

1. GLOBAL REPORT ON DIABETES WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Report on Diabetes; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2016; ISBN 9789241565257.
2. Di Pino, A.; DeFronzo, R.A. Insulin Resistance and Atherosclerosis: Implications for Insulin Sensitizing Agents. *Endocr. Rev.* **2019**, *1447–1467*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Libby, P.; Buring, J.E.; Badimon, L.; Hansson, G.K.; Deanfield, J.; Bittencourt, M.S.; Tokgözoğlu, L.; Lewis, E.F. Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Scheen, A.J. Cardiovascular effects of new oral glucose-lowering agents DPP-4 and SGLT-2 inhibitors. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 1439–1459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zannad, F.; Ferreira, J.P.; Pocock, S.J.; Anker, S.D.; Butler, J.; Filippatos, G.; Brueckmann, M.; Ofstad, A.P.; Pfarr, E.; Jamal, W.; et al. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: A meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials. *Lancet* **2020**. [[CrossRef](#)]
6. Lytvyn, Y.; Bjornstad, P.; Udell, J.A.; Lovshin, J.A.; Cherney, D.Z.I. Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibition in Heart Failure. *Circulation* **2017**, *136*, 1643–1658. [[CrossRef](#)]
7. Terasaki, M.; Hiromura, M.; Mori, Y.; Kohashi, K.; Nagashima, M.; Kushima, H.; Watanabe, T.; Hirano, T. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143396. [[CrossRef](#)]
8. Lee, D.M.; Battson, M.L.; Jarrell, D.K.; Hou, S.; Ector, K.E.; Weir, T.L.; Gentile, C.L. SGLT2 inhibition via dapagliflozin improves generalized vascular dysfunction and alters the gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 62. [[CrossRef](#)]
9. Gaspari, T.; Spizzo, I.; Liu, H.B.; Hu, Y.; Simpson, R.W.; Widdop, R.E.; Dear, A.E. Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2018**, *15*, 64–73. [[CrossRef](#)]
10. Han, J.H.; Oh, T.J.; Lee, G.; Maeng, H.J.; Lee, D.H.; Kim, K.M.; Choi, S.H.; Jang, H.C.; Lee, H.S.; Park, K.S.; et al. The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE $-/-$ mice fed a western diet. *Diabetologia* **2017**, *60*, 364–376. [[CrossRef](#)]

11. Nasiri-Ansari, N.; Dimitriadis, G.K.; Agrogiannis, G.; Perrea, D.; Kostakis, I.D.; Kaltsas, G.; Papavassiliou, A.G.; Randeve, H.S.; Kassi, E. Canagliflozin attenuates the progression of atherosclerosis and inflammation process in APOE knockout mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 106. [[CrossRef](#)]
12. Ye, Y.; Bajaj, M.; Yang, H.C.; Perez-Polo, J.R.; Birnbaum, Y. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2017**, *31*, 119–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Alicic, R.Z.; Neumiller, J.J.; Johnson, E.J.; Dieter, B.; Tuttle, K.R. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibition and diabetic kidney disease. *Diabetes* **2019**, *68*, 248–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lovshin, J.A.; Cherney, D.Z. Sodium transport in diabetes: Two sides to the coin. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 125–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zinman, B.; Wanner, C.; Lachin, J.M.; Fitchett, D.; Bluhmki, E.; Hantel, S.; Mattheus, M.; Devins, T.; Johansen, O.E.; Woerle, H.J.; et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 2117–2128. [[CrossRef](#)]
16. Neal, B.; Perkovic, V.; Mahaffey, K.W.; de Zeeuw, D.; Fulcher, G.; Erondu, N.; Shaw, W.; Law, G.; Desai, M.; Matthews, D.R. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 644–657. [[CrossRef](#)]
17. Perkovic, V.; Jardine, M.J.; Neal, B.; Bompoint, S.; Heerspink, H.J.L.; Charytan, D.M.; Edwards, R.; Agarwal, R.; Bakris, G.; Bull, S.; et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 2295–2306. [[CrossRef](#)]
18. Wiviott, S.D.; Raz, I.; Bonaca, M.P.; Mosenzon, O.; Kato, E.T.; Cahn, A.; Silverman, M.G.; Zelniker, T.A.; Kuder, J.F.; Murphy, S.A.; et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 347–357. [[CrossRef](#)]
19. McMurray, J.J.V.; DeMets, D.L.; Inzucchi, S.E.; Køber, L.; Kosiborod, M.N.; Langkilde, A.M.; Martinez, F.A.; Bengtsson, O.; Ponikowski, P.; Sabatine, M.S.; et al. A trial to evaluate the effect of the sodium–glucose co-transporter 2 inhibitor dapagliflozin on morbidity and mortality in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction (DAPA-HF). *Eur. J. Heart Fail.* **2019**, *21*, 665–675. [[CrossRef](#)]
20. Lee, T.M.; Chang, N.C.; Lin, S.Z. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *104*, 298–310. [[CrossRef](#)]
21. Lim, V.G.; Bell, R.M.; Arjun, S.; Kolatsi-Joannou, M.; Long, D.A.; Yellon, D.M. SGLT2 Inhibitor, Canagliflozin, Attenuates Myocardial Infarction in the Diabetic and Nondiabetic Heart. *JACC Basic Transl. Sci.* **2019**, *4*, 15–26. [[CrossRef](#)]
22. Beitelshes, A.L.; Leslie, B.R.; Taylor, S.I. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors: A case study in translational research. *Diabetes* **2019**, *68*, 1109–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ferrannini, E.; Muscelli, E.; Frascerra, S.; Baldi, S.; Mari, A.; Heise, T.; Broedl, U.C.; Woerle, H.J. Metabolic response to sodium–glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 499–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Merovci, A.; Solis-Herrera, C.; Daniele, G.; Eldor, R.; Vanessa Fiorentino, T.; Tripathy, D.; Xiong, J.; Perez, Z.; Norton, L.; Abdul-Ghani, M.A.; et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 509–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chen, Y.; Huang, L.; Qi, X.; Chen, C. Insulin receptor trafficking: Consequences for insulin sensitivity and diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Duckworth, W.C.; Bennett, R.G.; Hamel, F.G. Insulin Degradation: Progress and Potential*. *Endocr. Rev.* **1998**, *19*, 608–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Al-Sharea, A.; Murphy, A.J.; Huggins, L.A.; Hu, Y.; Goldberg, I.J.; Nagareddy, P.R. SGLT2 inhibition reduces atherosclerosis by enhancing lipoprotein clearance in Ldlr $-/-$ type 1 diabetic mice. *Atherosclerosis* **2018**, *271*, 166–176. [[CrossRef](#)]
28. Leng, W.; Ouyang, X.; Lei, X.; Wu, M.; Chen, L.; Wu, Q.; Deng, W.; Liang, Z. The SGLT-2 Inhibitor Dapagliflozin Has a Therapeutic Effect on Atherosclerosis in Diabetic ApoE $-/-$ Mice. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 6305735. [[CrossRef](#)]

29. Ganbaatar, B.; Fukuda, D.; Shinohara, M.; Yagi, S.; Kusunose, K.; Yamada, H.; Soeki, T.; Hirata, K.-i.; Sata, M. Empagliflozin ameliorates endothelial dysfunction and suppresses atherogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *875*, 173040. [[CrossRef](#)]
30. Rahadian, A.; Fukuda, D.; Salim, H.M.; Yagi, S.; Kusunose, K.; Yamada, H.; Soeki, T.; Sata, M. Canagliflozin Prevents Diabetes-Induced Vascular Dysfunction in ApoE-Deficient Mice. *J. Atheroscler. Thromb.* **2020**, 1–11. [[CrossRef](#)]
31. Pennig, J.; Scherrer, P.; Gissler, M.C.; Anto-Michel, N.; Hoppe, N.; Fünér, L.; Härdtner, C.; Stachon, P.; Wolf, D.; Hilgendorf, I.; et al. Glucose lowering by SGLT2-inhibitor empagliflozin accelerates atherosclerosis regression in hyperglycemic STZ-diabetic mice. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)]
32. Chin, K.L.; Ofori-Asenso, R.; Hopper, I.; Von Lueder, T.G.; Reid, C.M.; Zoungas, S.; Wang, B.H.; Liew, D. Potential mechanisms underlying the cardiovascular benefits of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors: A systematic review of data from preclinical studies. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 266–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vinué, Á.; Navarro, J.; Herrero-Cervera, A.; García-Cubas, M.; Andrés-Blasco, I.; Martínez-Hervás, S.; Real, J.T.; Ascaso, J.F.; González-Navarro, H. The GLP-1 analogue lixisenatide decreases atherosclerosis in insulin-resistant mice by modulating macrophage phenotype. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1801–1812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. González-Navarro, H.; Abu Nabah, Y.N.; Vinué, Á.; Andrés-Manzano, M.J.; Collado, M.; Serrano, M.; Andrés, V. p19ARF Deficiency Reduces Macrophage and Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis and Aggravates Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 2258–2268. [[CrossRef](#)]
35. Ortega, R.; Collado, A.; Selles, F.; Gonzalez-Navarro, H.; Sanz, M.-J.J.; Real, J.T.; Piqueras, L. SGLT-2 (Sodium-Glucose Cotransporter 2) Inhibition Reduces Ang II (Angiotensin II)-Induced Dissecting Abdominal Aortic Aneurysm in ApoE (Apolipoprotein E) Knockout Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 1614–1628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Herrero-Cervera, A.; Vinué, Á.; Burks, D.J.; González-Navarro, H. Genetic inactivation of the LIGHT (TNFSF14) cytokine in mice restores glucose homeostasis and diminishes hepatic steatosis. *Diabetologia* **2019**, *62*, 2143–2157. [[CrossRef](#)]
37. Andrés-Blasco, I.; Herrero-Cervera, A.; Vinué, Á.; Martínez-Hervás, S.; Piqueras, L.; Sanz, M.J.; Burks, D.J.; González-Navarro, H. Hepatic lipase deficiency produces glucose intolerance, inflammation and hepatic steatosis. *J. Endocrinol.* **2015**, *227*, 179–191. [[CrossRef](#)]
38. Martínez-Hervás, S.; Vinué, Á.; Nú, L.; Andrés-Blasco, I.; Piqueras, L.; Tomás Real, J.; Francisco Ascaso, J.; Jane Burks, D.; Jesús Sanz, M.; González-Navarro, H. Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc. Res.* **2014**. [[CrossRef](#)]
39. Andrés-Blasco, I.; Vinué, Á.; Herrero-Cervera, A.; Martínez-Hervás, S.; Nuñez, L.; Piqueras, L.; Ascaso, J.F.; Sanz, M.J.; Burks, D.J.; González-Navarro, H. Hepatic lipase inactivation decreases atherosclerosis in insulin resistance by reducing LIGHT/lymphotoxin β -receptor pathway. *Thromb. Haemost.* **2016**, *116*, 379–393. [[CrossRef](#)]
40. González-Navarro, H.; Vinué, Á.; Sanz, M.J.; Delgado, M.; Pozo, M.A.; Serrano, M.; Burks, D.J.; Andrés, V. Increased dosage of Ink4/Arf protects against glucose intolerance and insulin resistance associated with aging. *Aging Cell* **2013**, *12*, 102–111. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



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



Review

Therapies for the Treatment of Cardiovascular Disease Associated with Type 2 Diabetes and Dyslipidemia

María Aguilar-Ballester ^{1,†}, Gema Hurtado-Genovés ^{1,†}, Alida Taberner-Cortés ^{1,†}, Andrea Herrero-Cervera ¹, Sergio Martínez-Hervás ^{1,2,3,4,*} and Herminia González-Navarro ^{1,4,*}

¹ Health Research Institute Clinic Hospital of Valencia-INCLIVA, 46010 Valencia, Spain; abama4@alumni.uv.es (M.A.-B.); gehurge@alumni.uv.es (G.H.-G.); altacor@doctor.upv.es (A.T.-C.); anhecer@alumni.uv.es (A.H.-C.)

² Endocrinology and Nutrition Service, Clinic Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain

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

⁴ CIBERDEM (Diabetes and Associated Metabolic Diseases), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: sergio.martinez@uv.es (S.M.-H.); herminia.gonzalez@uv.es (H.G.-N.); Tel.: +34-963864403 (H.G.-N.); Fax: +34-963987860 (H.G.-N.)

† Equal contribution.

Abstract: Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death worldwide and is the clinical manifestation of the atherosclerosis. Elevated LDL-cholesterol levels are the first line of therapy but the increasing prevalence in type 2 diabetes mellitus (T2DM) has positioned the cardiometabolic risk as the most relevant parameter for treatment. Therefore, the control of this risk, characterized by dyslipidemia, hypertension, obesity, and insulin resistance, has become a major goal in many experimental and clinical studies in the context of CVD. In the present review, we summarized experimental studies and clinical trials of recent anti-diabetic and lipid-lowering therapies targeted to reduce CVD. Specifically, incretin-based therapies, sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors, and proprotein convertase subtilisin kexin 9 inactivating therapies are described. Moreover, the novel molecular mechanisms explaining the CVD protection of the drugs reviewed here indicate major effects on vascular cells, inflammatory cells, and cardiomyocytes, beyond their expected anti-diabetic and lipid-lowering control. The revealed key mechanism is a prevention of acute cardiovascular events by restraining atherosclerosis at early stages, with decreased leukocyte adhesion, recruitment, and foam cell formation, and increased plaque stability and diminished necrotic core in advanced plaques. These emergent cardiometabolic therapies have a promising future to reduce CVD burden.

Keywords: cardiometabolic risk; incretin system; dipeptidyl peptidase 4; sodium-glucose-co-transporter 2 inhibitors; proprotein convertase subtilisin kexin 9

Citation: Aguilar-Ballester, M.; Hurtado-Genov, G.; Taberner-Cortés, A.; Herrero-Cervera, A.; Martínez-Hervás, S.; González-Navarro, H. Therapies for the treatment of cardiovascular disease associated with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 660. <https://doi.org/10.3390/ijms22020660>

Received: 11 December 2020

Accepted: 7 January 2021

Published: 11 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Despite the existence of different cardiometabolic drugs, cardiovascular disease (CVD) remains the first cause of death worldwide [1]. A main classical risk factor is elevated blood levels of LDL-cholesterol (LDL-C) in the blood which are closely related to atherosclerosis, [2] and constitute the first line of therapy [3]. However, the change in life-style patterns that promotes sedentarism and an aging of the population have raised the incidence of type 2 diabetes (T2DM), thus becoming a major emergent risk. T2DM features are frequently associated with hypercholesterolemia, dyslipidemia, hypertension, and obesity which altogether represent a cardiometabolic risk whose main complication is the atherosclerotic disease [4].

In recent decades, several mechanisms have been shown to contribute to aggravating atherosclerosis in T2DM patients [5]. Insulin resistance (IR) which plays a pivotal role in

the onset of T2DM, increases endothelial cell (EC) dysfunction by diminishing the bioavailability of vasodilators like nitric oxide (NO) [6]. Other mechanisms include IR induced apoptosis in macrophages [4] and reduced survival in vascular smooth muscle cells (VSMC) [7] in lesions. Notably, these seem to be due to inflammatory signaling pathways that promote plaque instability and rupture [4,7,8]. Moreover, hyperglycemia contributes to glucotoxicity and exerts in the vascular bed a proatherogenic synergistic effect alongside dyslipidemia and hypertension. These and other mechanistic studies led to the hypothesis that anti-diabetic drugs might exert atheroprotection by acting directly in vascular cells, prompting many experimental studies and clinical trials to study the expanded use of these drug therapies in additional cardiovascular contexts [9,10].

In the following sections, we will summarize the main current strategies for the management of carbohydrate and lipid metabolism and their relationship with CVD. These include incretin-based therapies, sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors (SGLT2i), and proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) inhibitors. A schematic summary of clinical trials over the years is displayed in Figure 1.

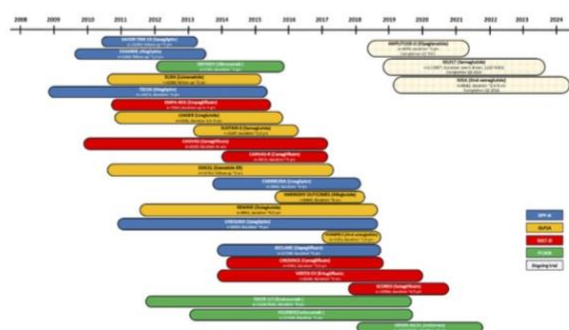


Figure 1. Clinical trials with cardiovascular end-points for T2DM patients in trials for incretin-based and SGLT2i therapies and with LDL-C percentage change from baseline end-points for trials testing PCSK9i. Based on <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (accessed 10 December 2020).

2. Therapies based on the Incretin System

2.1. Biology of the Incretins

Incretin hormones are small gut-derived peptides secreted by the endocrine cells of the intestine, mainly in the postprandial state, with potent insulinotropic actions. There are two main incretin hormones, the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), secreted by the enteroendocrine K cells, and the glucagon-like peptide 1 (GLP1), secreted by the gut L cells of the distal small intestine and large bowel [11,12].

GLP1 is produced in response to nutrient intake, mainly sugars and fat, and its two active forms are the GLP1-(7–37) and the GLP1-(7–36)NH(2) generated by selective cleavage of the proglucagon molecule [13]. The GLP1 hormone exerts its effects through the GLP1 receptor (GLP1R) located in the gastrointestinal tract and pancreatic β -cells. However, it is also found in the heart, VSMCs, EC, immune cells, lung, kidney, and nervous system [13]. This protein is a G coupled receptor that mediates GLP1 actions to modulate glucose levels and body weight [13]. In β -cells GLP1 promotes the de novo synthesis and secretion of insulin by increasing cAMP and intracellular calcium levels. GLP1 also enhances β -cell number and mass through β -cell proliferation and neogenesis and decreases glucagon secretion in a glucose-dependent fashion that prevents hypoglycemia. These actions are concomitant to a reduction in food intake, gastric emptying, nutrient absorption and disposal, reduction of appetite by stimulation of the brain satiety center, and en-

hanced insulin sensitivity in periphery tissues [11]. GLP1 hormone is present at low concentrations in the circulation in fasting and inter-prandial state but, within minutes of food intake, its levels rise up to 2–3 times leading to postprandial insulin secretion [13]. GLP1 in the circulation has a very short half-life and, within 1.5 to 5 min, it is rapidly degraded by the dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) into smaller peptides whose functions are not fully understood [14].

GIP production in the enteroendocrine K-cells of the proximal small intestine is mediated by the prohormone convertase (PC) one-third to a full-length peptide form. Alternatively, GIP can be processed by the PC2 to a C-terminal truncated form named GIP(1-30) [11] and it can be secreted under carbohydrate and fat regulation. In β -cells, GIP promotes insulin secretion by increasing cAMP and calcium intracellular levels and by regulating voltage-potassium Kv channel expression. Since its receptor, GIPR, is expressed in multiple tissues—such as the pancreas, gastrointestinal tract, adipose tissue, heart, testis, bone, lung, adrenal cortex, and central nervous system—other effects are under study. In the pancreas, GIP and GLP1 functions overlap, although inactivation of GIP in mice leads to impaired glucose tolerance and insulin release, hence indicating its metabolic relevance [11].

2.2. Degradation of the Incretins by Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4)

GLP1 and GIP incretins are cleaved by DPP4 during the passage across the hepatic bed. They are further processed in peripheral tissues into smaller metabolites to be finally eliminated by the kidney. DPP4, also known as CD26, is a transmembrane cell surface glycoprotein that cleaves N-terminal dipeptides position, mostly from GLP1 and GIP, thus holding an important antihyperglycemic effect. DPP4 is mainly expressed in exocrine glands and absorptive epithelium, hepatocytes, fibroblasts, leukocytes, and epithelial cells of the kidney and intestine [15]. It can be found membrane-bound or soluble.

DPP4 is also an adipokine produced by proteolytic cleavage from fully differentiated adipocytes [16] in some settings. Its production correlates with the degree of IR, inflammation, adipocyte size, and the amount of visceral adipose tissue (VAT) [16,17]. Both insulin and TNF α increase up to 50% the release of soluble DPP4 and it is believed to participate in the crosstalk between adipocytes, macrophages, and the inflamed stroma-vascular fraction [16]. DPP4 levels increase with insulin and leptin and inversely correlate with age and adiponectin levels [16,18].

Consistently, rats with genetic DPP4 deficiency, such as the strain F344/DuCrj or Dark Agouti rats, display improved IR, glucose tolerance, lipid profile, and enhanced GLP1 activity. Likewise, DPP4-deficient mice have enhanced glucose tolerance, glucose-stimulated insulin, and GLP1 release, and improved insulin sensitivity and liver homeostasis [19]. Dendritic cells (DC) and macrophages from VAT, in mice and humans, exhibit elevated DPP4 levels which promote T cell activation, proliferation, and inflammation [20]. In ECs, DPP4 promotes T cell transendothelial migration [21] and in human VSMCs promotes inflammation. Hepatic DPP4 secretion is elevated in obesity and IR while specific hepatic DPP4 deletion through a short hairpin RNA (shRNA) strategy diminished adipose tissue macrophage infiltration and IR [22]. In agreement with these studies, T2DM patients also display reduced levels of GLP1 hormone and enhanced DPP4 in the circulation, and IR correlates with the levels of DPP4 released by adipose tissue depots [23].

Altogether indicates that incretin-based therapies display anti-inflammatory and cardiovascular benefits by mechanisms independently from their glucose-lowering effect. Soluble DPP4 has been shown to induce VSMC proliferation by activating mitogen-activated protein kinases (MAPK)-pathway and the nuclear factor kappa B (NF- κ B)-mediated inflammation [24]. Likewise, GLP1 hormone activates thymocytes and T cell proliferation and maintains regulatory T cells [25]. Because of this, they have been tested as therapeutic drugs for the treatment of CVD in T2DM patients. Currently, there are two different strategies to increase the benefits of the incretin system: (1) inhibition of the peptidase DPP4 and (2) the use of GLP1 and GIP incretin analogues [26].

2.3. DPP4 Inhibitors as a Therapeutic Target for T2DM

The gliptins are a family of DPP4 inhibitors developed as glucose-lowering agents that increase the half-life and bioavailability of the GLP1 incretin. These display fewer adverse side effects [27] and a low incidence of hypoglycemia [18]. The gliptins can be peptidomimetics and non-peptidomimetics, and both are extracellular competitive reversible inhibitors of the DPP4 substrate. These two groups differ in their half-lives, the strength of the effect, and therapeutic dose being the most currently prescribed: sitagliptin [28] saxagliptin [29], alogliptin [30], linagliptin [18,31], vildagliptin [32], anagliptin, and teneligliptin [18].

Most of them have shown a low frequency of hypoglycemia, pancreatitis, and pancreatic carcinoma, and no effects on heart failure (HF) rate or major adverse cardiovascular events (MACE) effects [27] except for alogliptin [30] and saxagliptin [29], which increase the rate of HF.

2.4. Effects of DPP4 Inhibitors in CVD

Although the initial rationale for DPP4 inhibition is the subsequent increase in GLP1 effects, other independent mechanisms have been reported. Thus, beneficial effects have been reported in adipose tissue, vascular ECs, and monocyte/macrophages during atherosclerosis and myocardial injury in preclinical studies as described below, some of them summarized in [33]. In Table 1, a description of the mechanisms found in the preclinical animal model studies and the effects on atherosclerosis are included for incretin-therapies.

Table 1. Preclinical studies of incretin-based therapies in animal models of atherosclerosis, vascular injury, and myocardial infarction

Animal Model	Incretin Therapy	Mechanism of Action	Reported Effects	References	
<i>ApoE</i> ^{-/-} mice	DPP4i Anagliptin	Suppressed VSMCs proliferation and macrophages inflammatory responses	Restrained atherosclerosis	[34]	
	DPP4i Linagliptin+HF D	Anti-inflammatory phenotype of macrophages	Improved atherosclerosis	[35]	
	GIP active forms	Decreased VSMCs proliferation, monocyte infiltration, foam cell formation and related genes (<i>Cd36</i> , <i>Acat1</i>), and NF-κB-mediated inflammation in macrophages	Stabilization of atherosclerotic plaque	[36]	
	GIP and GLP1	Suppressed foam cell formation	Reduced atheroma plaque	[37]	
	Liraglutide		Suppressed <i>Acat1</i> expression and foam cell formation	Decreased atherosclerosis	[38]
			Anti-inflammatory macrophage polarization	Reduced atherosclerosis	[39]
		Exenatide+CS	Reduced oxidative stress and inflammation	Reduced plaque	[40]
	Exendin-4	Reduced monocyte adhesion and pro-inflammatory cytokines via cAMP/PKA pathway	Decreased lesion size	[41]	
APOE*3-Leiden.CETP mice	Exendin-4	Decreased monocyte recruitment and adhesion and foam cell formation	Reduced atherosclerotic lesions	[42]	

<i>Apoe^{-/-}Irs2^{+/-}</i> mice	Liraglutide Lixisenatide	STAT3-mediated macrophage polarization to an anti-inflammatory phenotype	Decreased atherosclerosis, necrotic core	[43]
<i>Apoe^{-/-}</i> and <i>Ldlr^{-/-}</i> mice	Liraglutide Semaglutide+ WD	Changes in inflammatory markers	Reduced lesion size	[44]
<i>Ldlr^{-/-}</i> mice	DPP4i	Decreased pro-inflammatory genes expression and macrophage content	Decreased plaque size	[45]
Arterial hypertension Angiotensin II- mouse model	Liraglutide	Reduced leukocyte rolling and neutrophils infiltration	—	[46]
C57Bl6 mice	Liraglutide+45 % HFD	Reduced eNOS expression and ER-stress response	Reduced cardiac fibrosis, hypertrophy, and necrosis	[47]
Myocardial injury mouse model	Liraglutide	Enhanced GSK3 β , PPAR β - δ , Nrf-2, and HO-1 genes	Reduced mortality, infarct size, and rupture	[48]
Ischemia-reperfusion injury rats	Lixisenatide	---	Reduced infarct-size, improved cardiac function	[49]
Restenosis mouse/rat model	Lixisenatide Exendin-4	Reduced VSMC proliferation	Neointimal hyperplasia	[50]
Diabetic rats	Liraglutide	Decreased macrophage ER-stress-induced secretion of microvesicles	Diminished atherosclerosis and intima thickening	[51]
	GLP1+adenovirus-mediated delivery	Reduced VSMC and monocyte migration and inflammation	Reduced intima thickening	[52]
Rabbits	DPP4i Anagliptin+CD	Reduced macrophage infiltration	Restrained atherosclerosis	[53]
WHHL rabbits	Lixisenatide	Reduced macrophage, calcium deposition, necrosis	Prevention of plaque growth and instability	[54]

ACAT1: acetyl-CoA acetyltransferase; CD: cholesterol diet; CS: chronic stress; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; ER: endoplasmic reticulum; HFD: high fat diet; VSMCs: vascular smooth muscle cells; WD: western diet; WHHL: Watanabe heritable hyperlipidemic.

2.4.1. Mechanisms of Gliptins in Experimental Atherosclerosis

High levels of soluble DPP4 are found in atherosclerosis and many studies have shown that its inhibition results in restrained atherosclerosis progression (Table 1).

Combination of DPP4 inhibitors with granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) have shown protection against cardiovascular injury by increasing the number of endothelial stem cell and improving cardiac function [25]. The mechanism was an inhibition of DPP4-mediated degradation of the chemokine stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) which promotes endothelial progenitor cells (EPC) bone marrow mobilization to sites of cellular injury [55,56]. In this sense, SDF engineered to be DPP4-resistant showed improved blood flow in an animal model of peripheral artery disease [25].

In human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), alogliptin induces endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and AKT phosphorylation leading to enhanced NO production and improved homeostasis [24]. Likewise, alogliptin also promoted vascular relaxation via eNOS production of NO and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated mechanisms [55]. Ex vivo DPP4 inhibition of human arteries from patients undergo-

ing coronary artery bypass surgery reduced vascular oxidative stress and improved endothelial function [57]. DPP4 inhibitor treatment of HUVECs cultured under hypoxic condition prevented apoptosis in a CXCR4/STAT3-dependent manner [58].

In VSMCs, DPP4 activates MAPK and NF- κ B increasing proliferation and production of iNOS proinflammatory cytokines [24]. Consistently, in *Apoe*^{-/-} mice, anagliptin restrained atherosclerosis by suppressing VSMC proliferation [34].

DPP4 inhibition also modulates immune cells and inflammation. In diabetic patients, DPP4 inhibitors treatment resulted in a reduced production of reactive oxygen species and inflammatory mediators TNF α , JNK1, TLR2, TLR4, IL1 β , and SOCS3 by monocytes [25]. DPP4 is highly expressed in bone marrow-derived CD11b⁺ cells. In *Lldr*^{-/-} mice, DPP4 inhibitors downregulated proinflammatory genes and diminished aortic plaque macrophage content and lesion size [45]. In agreement with these results, treatment with linagliptin of high-fat diet-fed *Apoe*^{-/-} mice, ameliorated atherosclerosis by inducing an anti-inflammatory phenotype in macrophages [35]. Likewise, anagliptin treatment restrained atherosclerosis by reducing macrophage plaque infiltration in cholesterol-fed rabbits [53] and suppressed inflammatory responses in macrophages in *Apoe*^{-/-} mice [34].

In T cells, the non-cleaved membrane-bound DPP4 interacts with the T cell receptor (TCR)/CD3, promoting the phosphorylation cascade and antigen-presenting cell interactions engaging NF- κ B inflammatory pathway activation [17].

2.4.2. Clinical Studies on DPP4 inhibitors in T2DM with CVD

Both sitagliptin and anagliptin are being evaluated in clinical trials for their potential in the regulation of lipid metabolism and CVD in T2DM patients (Table 2). Anagliptin has been shown to decrease LDL-C triglycerides, total cholesterol, and non-HDL-C levels in a mechanism independent from its hypoglycemic effects [59]. Other gliptins increase adiponectin levels and reduce intestinal cholesterol absorption [18].

Table 2. Clinical trials of incretin-based therapies

Incretin-Therapy	Clinical Trial	Patients	Reported Effects	References
DPP4i saxagliptin	SAVOR-TIMI 53 [NCT01107866]	T2DM patients with CV risk	-Unaffected CV risk -Increased HF hospitalization rate	[29]
DPP4i alogliptin	EXAMINE [NCT00968708]	T2DM patients with ACS	-Unaffected CV death and hospital admission for HF	[30]
DPP4i sitagliptin	TECOS [NCT00790205]	T2DM patients with established CVD	-Unaffected MACE or hospitalization for HF risk	[60]
DPP4i Linagliptin	CAROLINA [NCT01243424]	T2DM patients and CV risk	-Unaffected CV risk	[61]
	CARMELINA [NCT01897532]	T2DM patients and CV risk and kidney disease	-Unaffected HF incidence -No influence of kidney disease -Reduced albuminuria	[31,62]
Lixisenatide (exendin-4 ELIXA based)	[NCT01147250]	T2DM patients with a recent ACS	-No effects on MACE, hospitalization for HF -Decreased SBP and heart rate	[63]
Exenatide (exendin-4 synthetic)	EXSCEL [NCT01144338]	T2DM patients with or without CVD	-Unaffected incidence of MACE, retinopathy or renal outcomes	[64]
			-Modest reduction in SBP but increased heart rate	
Liraglutide (human GLP1A)	LEADER [NCT01179048]	T2DM patients at high CV risk	-Modest reduction in CV risk	[65]
			-Reduced rates of MACE and death	
			-Reduced SBP and microvascular renal and retinal complications	[66]
			-Enhanced heart rate	

			-Same benefits for polyvascular and single vascular disease	[67]
			-Reduced CV outcomes (MI/stroke) and CVD	[68]
			-Unaffected HF hospitalization and death risk after MI	[69]
			-Decreased rates of diabetic kidney disease	[70]
Semaglutide (human GLP1A)	SUSTAIN-6 [NCT01720446]	T2DM patients at high CV risk	-Reduced rates of CV death and non-fatal MI/stroke -Decreased SBP but enhanced mean pulse rate	[71]
	PIONEER 6 [NCT02692716]	T2DM patients with high CV risk	-Unaffected CV risk -Decreased SBP and LDL-C -Gastrointestinal adverse events	[72]
Albiglutide (modified human GLP1)	Harmony Outcomes [NCT02465515]	T2DM and CVD patients	-Decreased SBP but augmented heart rate -improved glomerular filtration rate -Reduced risk of MACE -Unaffected CV death	[73]
Dulaglutide (modified human GLP1)	REWIND [NCT01394952]	T2DM patients at high CV risk	-Unaffected all-cause mortality rate -Decreased SBP, pulse pressure and arterial pressure but enhanced heart rate -Reduced risk of CV outcomes, total CV, or fatal event burden	[74,75]
Dulaglutide (modified human GLP-1) and tirzepatide (LY3298176)	SURPASS-CVOT [NCT04255433]	T2DM patients with atherosclerotic CVD	Estimated completion date: October 2024	https://clinicaltrials.gov/NC04255433
Efpeglenatide	AMPLITUDE-O [NCT03496298]	T2DM patients with high CDV risk	Estimated completion date: April 2021	https://clinicaltrials.gov/NC03496298
NNC0090-2746 (RG7697) [NCT02205528]	Phase 2 trial	T2DM patients	-Improved glycemia control -Diminished body weight, cholesterol, and leptin.	[76]
Tirzepatide (LY3298176) [NCT03131687]	Phase 2 trial	T2DM patients	-Improved glycemic and body weight control -Enhanced pulse rate -Acceptable safety and tolerability profile	[77,78]

ACS: acute coronary syndrome; HF: heart failure; CV: cardiovascular; CVD: cardiovascular disease; DBP: Diastolic blood pressure ; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol ; MACE: major adverse cardiovascular events; MI: myocardial infarction; SBP: systolic blood pressure; T2DM: type 2 diabetes mellitus.

Over the years, the cardiosafety of DPP4 inhibitors in T2DM patients with high cardiovascular risk has been confirmed in several clinical trials (Table 2). The SAVOR-TIMI 53 trial [29], the EXAMINE trial [30], the TECOS trial [60], and the CAROLINA [61] and CARMELINA [31,62] trials, that evaluated saxagliptin, alogliptin, sitagliptin, and linagliptin treatment, respectively, are considered the most important. Nevertheless, no cardiovascular benefits were reported in comparison with the placebo group. In fact, in the SAVOR-TIMI 53 trial, an increase in the rate of HF in patients with no previous history, was detected in the treated groups. The SAVOR-TIMI 53 trial [29], the EXAMINE trial [30]

and TECOS trial [60] showed very low frequencies of hypoglycemia, pancreatitis, and pancreatic carcinoma [27]. However, the CARMELINA trial did not detect any effect on kidney disease or cardiovascular and kidney events.

2.5. GLP1 Analogues as Therapeutic Strategies

2.5.1. Development of Drugs based on GLP1 and Rational Design

Given that GLP1 stimulates insulin secretion, soon after its discovery, this incretin became useful for T2DM treatment [79]. The native peptide has no clinical applicability due to its short plasma life-time of less than 2 min [80]. Therefore, the GLP1 analogues (GLP1A) approved for clinical use [81] are either derivatives of the human native GLP1, with chemical modifications to increase its stability and half-life [82] or peptides based on exendin-4. Exendin-4 is a GLP1A peptide isolated from the saliva of the lizard *Heloderma suspectum* [83], whose amino acid identity of 53% to the mammalian GLP1 that allows it to bind to the human GLP1 receptor [11].

Exenatide was the first GLP1A approved in 2005 and it is a synthetic version of the exendin-4. It has a half-life of up to 2.4 h, 10 times longer than endogenous GLP1, because its resistance to human DPP4 degradation [81,82]. Since the first generated GLP1As have a subcutaneous administration twice daily, other compounds have been developed to extend durability [84]. The optimization approach was addressed to keep the human GLP1 backbone to avoid immunogenic problems [84] and to get DPP4 action resistance through GLP1-(7-36) region modifications [26,81]. These modifications consist in the replacement of the penultimate alanine at the N-terminal end of the peptide by a glycine, serine, D-alanine, or by the most optimal chemical group, aminoisobutyric acid (Aib) [80], since it does not interfere with GLP1 receptor binding [85]. Other modifications were a replacement of the histidine residue at the N-terminal end by a glucitol group or by performing a deamination [80]. To increase the GLP1 half-life, the addition of fatty acids to the C-terminal domain was also performed to allow binding to the albumin and protection to renal filtration [26,86].

By combining all of the above-mentioned modifications, the approved GLP1As were designed and generated progressively over time: liraglutide (2009), exenatide (2005) and exenatide once-weekly (2011), lixisenatide (2013), albiglutide (2014) dulaglutide (2014), and semaglutide (2017), whose specific modifications can be found elsewhere [79,81].

These compounds have shown favorable effects in experimental and clinical studies with the limitation of parenteral administration [26,82]. Therefore, current research is focused on developing novel small GLP1As to be administered orally [26,84]. Among these, oral semaglutide stands out, which is a small acetylated peptide [79] whose oral daily administration has recently been approved in combination with sodium N-(8-(2-hydroxybenzoyl) amino) caprylate (SNAC) [84].

2.5.2. Studies in Preclinical Models of T2DM, Atherosclerosis, and CVD

As summarized in Table 1, studies in rodents and rabbits have shown beneficial actions of GLP1As in atherosclerosis, vascular injury, and cardiac function. Liraglutide treatment in diabetic rats led to diminished atherosclerotic lesion formation and intima-media thickening through a decrease of macrophage secretion of ER-stress induced microvesicles [51]. Similarly, the expression of GLP1 by adenovirus-mediated delivery in diabetic rats reduced intima-media thickening, VSMC and monocyte migration, and inflammatory processes [52].

In *Apoe*^{-/-} mice, treatment with both native GIP and GLP1 incretins diminished atherosclerosis by suppressing macrophage foam cell formation [37]. In *Apoe*^{-/-} mice liraglutide suppressed acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 1 (*Acat1*) expression, foam cell formation and decreased atherosclerosis [38], and inhibited progression of early-onset atherosclerosis lesions in a GLP1R-dependent fashion [87]. Liraglutide administration

also improved cardiac function through reduced cardiac fibrosis, hypertrophy, and necrosis by ameliorating endothelial NOS expression and ER-stress response in 45% high-fat diet (HFD) fed C57Bl6 mice [47].

Studies conducted by us have shown diminished atherosclerosis by lixisenatide and liraglutide in a mouse model of atherosclerosis and IR, the *ApoE^{-/-}Irs2^{+/-}* mice. Moreover, lixisenatide generated more stable plaques with thicker fibrous caps, smaller necrotic cores, and reduced inflammatory cell infiltration [43]. Lixisenatide also promoted macrophage polarization toward a pro-resolving phenotype in a STAT3-dependent manner [43]. A similar mechanism was found in *ApoE^{-/-}* mice where liraglutide modulated polarization of macrophages toward a pro-resolving phenotype too [39]. Likewise, exenatide exerted protective effects in cultured macrophages via STAT3 activation which promoted adiponectin secretion when co-cultured with 3T3-L1 adipocytes [88]. In another investigation, liraglutide, and semaglutide treatments reduced lesion development in both *ApoE^{-/-}* and *Low density lipoprotein-deficient (Ldlr^{-/-})* mice fed western diet, through major changes in inflammatory markers in aortic tissue [44]. Similarly, exenatide beneficial effects in atherosclerosis in *ApoE^{-/-}* mice were attributed to reduced plaque oxidative stress, inflammation, and proteolysis in mice under chronic stress [40]. In the same line of results, lixisenatide treatment of Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits prevented plaque growth and instability by decreasing macrophage infiltration, calcium deposition, and necrosis, as well as increased fibrotic content in VSMC-rich plaques [54]. On the other hand, exendin-4 treatment also decreased lesion size in *ApoE^{-/-}* mice through a reduction of monocyte adhesion and expression of pro-inflammatory cytokines in activated macrophages via cAMP/PKA pathway [41]. Exendin-4 also diminished liver inflammation and atherosclerotic lesions through monocyte/macrophage recruitment and adhesion, and foam cell formation in the atherosclerotic mouse model *APOE*3-Leiden.CETP* [42].

In *in vitro* studies, treatment of HUVECs with exendin-4 [89] or liraglutide [90] incremented the activity, phosphorylation, and protein levels of eNOS, thus protecting against proatherosclerotic factors [89,90]. Besides, liraglutide in HUVECs diminished high-glucose-induced NF- κ B phosphorylation and associated endothelial dysfunction [90]. Liraglutide also alleviated TNF α and LPS-mediated monocyte adhesion in cultured human aortic endothelial cells (HAECs) by increasing Ca²⁺ and CAMKK β /AMPK activities and diminishing E-selectin and VCAM1 expression [91]. On the other hand, exendin-4 reversed glucolipotoxic gene dysregulation in diabetic human coronary artery endothelial cells (HCAECs) by upregulating eNOS and proangiogenic genes, while downregulating inflammatory, prothrombotic, and apoptosis genes [92].

In ischemia-reperfusion injury rat models (Table 1), prolonged treatment with lixisenatide reduced infarct-size and improved cardiac function [49]. Furthermore, in restenosis mouse and rat models, exendin-4 and lixisenatide reduced VSMC proliferation and neointimal hyperplasia, respectively [50]. In a mouse model of myocardial injury, liraglutide pretreatment reduced mortality and infarct size by enhancing cardioprotective genes such as PPAR β - δ , Nrf-2, and HO-1. Moreover, liraglutide-treated cardiomyocytes displayed diminished caspase-3 activation and increased cAMP production [48]. In another study, which employed an arterial hypertension angiotensin II-mouse model, liraglutide reduced leukocyte rolling and infiltration of myeloid neutrophils into the vascular wall [46].

2.5.3. Clinical Studies on GLP1-based Strategies in T2DM with CVD

Many clinical trials based on GLP1 analogues have been designed to approve their use in CVD complications in T2DM subjects (Table 2).

In the ELIXA (Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome [NCT01147250]) trial, T2DM patients with a recent acute coronary syndrome were enrolled to test a daily injection of lixisenatide, an exendin-4-based analogue, for 25 months. Results showed no effects on MACE or other serious adverse events in T2DM patients who had recently suffered an acute coronary event [63]. The HF hospitalization rates and

death remained unchanged but systolic blood pressure (SBP) and heart rate were reduced [63].

The effect on cardiovascular events of weekly injections of exenatide, another exen-din-4 based analogue, was evaluated in the EXSCEL [NCT01144338] clinical trial. The study included T2DM patients of which 70% exhibited CVD and 30% did not displayed any CVD. In this study CVD was defined as atherosclerosis peripheral artery disease, coronary artery disease or stroke. The follow-up of patients, which were randomly treated with once-weekly exenatide (2 mg) or placebo for 5 years, did not show differences in MACE. A modest decrease in SBP and LDL-C was seen but treated patients also showed enhanced heart rate. The lack of effect was related to a shorter follow-up period and lower glycated hemoglobin baseline levels in the patients that in the other trials [64]. Once-weekly exenatide did not affect retinopathy or renal outcomes and produced a modest reduction in CV risk in subjects with mild loss of kidney function (estimated glomerular filtration rate, eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m²) [65].

In the LEADER (Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results [NCT01179048]) clinical trial, the human GLP1-based analogue liraglutide or placebo were administered once daily as a subcutaneous injections to T2DM patients at high cardiovascular risk with a median follow-up of 3.8 years. In the first analysis, the treated group had lower rates of cardiovascular events and death from any cause but they also suffered more episodes of gallstone disease. The liraglutide group displayed a reduced risk of MACE, defined as cardiovascular death, non-fatal stroke, and non-fatal, first or recurrent MI. Analysis of vascular function showed decreased SBP and microvascular retinal and renal complications but also augmented DBP and heart rate [66]. A second analysis of this trial indicated the same benefits for polyvascular and single vascular disease in T2DM patients, independently of a previous history of MI [67]. In a posthoc analysis which took into account T2DM patients with high cardiovascular risk—due to MI, stroke, or atherosclerosis—liraglutide reduced cardiovascular outcomes [68]. In another analysis of the LEADER trial, there was no evidence of decreased cardiovascular outcomes in patients with MI treated with liraglutide [69]. In a third clinical study, liraglutide treatment in T2DM patients resulted in a lower rate of diabetic kidney disease development and progression than placebo [70].

Likewise, semaglutide, whose structure is also based on human GLP1, injected once-weekly at two doses (0.5 mg or 1.0 mg) for 104 weeks in the SUSTAIN-6 trial (NCT01720446) reduced the rate of cardiovascular death and non-fatal MI and stroke in patients with T2DM at high cardiovascular risk. Consistent with the other GLP1A, SBP was reduced but mean pulse rate enhanced [71]. However, in the PIONEER 6 (NCT02692716) trial, once-daily oral semaglutide did not alter the cardiovascular risk profile of T2DM patients at high cardiovascular risk, but decreased SBP and LDL-C parameters. Moreover, gastrointestinal adverse events were more common in patients receiving oral semaglutide than patients with placebo [72].

Another chemical variant of human GLP1, albiglutide, which consists of two tandem copies of modified human GLP1 bound to human albumin, showed increased effectivity due to its long-acting effect. In the Harmony Outcomes (NCT02465515) clinical trial, albiglutide in subjects of 40 or more years of age with T2DM and CVD, showed reduced MACE, SBP, and improved glomerular filtration rate in a follow up of 1.6 years. However, no effect was observed in death from cardiovascular causes [73].

A long-acting GLP1A, called dulaglutide, has also been generated. This analogue is the human GLP1 peptide covalently linked to a Fc fragment of a human IgG4 that protects against DPP4 degradation. The REWIND (NCT01394952) clinical trial, which tested weekly subcutaneous injection of dulaglutide in T2DM patients with a previous cardiovascular event or cardiovascular risk factors, showed no effect in all-cause mortality rate but reduced the risk of CV outcomes, SBP, pulse and arterial pressure although increased heart rate [74]. A subsequent analysis showed that weekly subcutaneous dulaglutide injections reduced total cardiovascular or fatal event burden [75].

Ongoing clinical trials are the SURPASS-CVOT (NCT04255433) with an estimated enrollment of 12,500 participants and the AMPLITUDE-O (NCT03496298) with 4076 patients. In the first trial, the effect in MACE of two incretins, tirzepatide (LY3298176) and dulaglutide is being compared in T2DM patients and the completion date of the study is in October 2024 (<https://clinicaltrials.gov/NCT04255433>). The second trial studies the effect of efpeglenatide in T2DM patients at high CVD risk and its estimated completion date is April 2021 (<https://clinicaltrials.gov/NCT03496298>).

2.6. GIP1 Emergent Therapies

2.6.1. Development of Drugs based on GIP and Rational Design

Currently, there are no clinical therapies using GIPR agonists [93]. Experimental results of GLP1R/GIPR dual co-agonists derived from intermixed incretin sequence have shown augmented antihyperglycemic and insulinotropic effect compared with specific GLP1 agonist in *db/db* mice, ZDF diabetic rats, monkeys and humans [94,95]. Moreover, these dual agonists have been shown to reduce plasma biomarkers of cardiovascular risk in diet-induced obese mice [95,96].

2.6.2. Investigations of GIP Therapies in Preclinical Models

GIP has been related to different signalling pathways in vascular cells with both anti-atherogenic via NO production, or pro-atherogenic effects through increased endothelin-1 and VSMCs osteopontin expression [93]. In HUVECs cultures GIP/GIPR and GLP1/GLP1R interactions reduce the advanced glycation end products (AGEs) receptor (RAGE) expression, blocking the signalling pathways associated with diabetes-associated vascular damage [97].

On the other hand, as shown in Table 1, GIPR levels are diminished in diabetic experimental models and consequently, administration of GIP in *Apoe*^{-/-} and *db/db* diabetic mice reduced atherosclerotic plaque lesions and foam cell formation [37,98]. Furthermore, the administration of GIP active forms to *Apoe*^{-/-} mice increased atherosclerotic collagen content [36], suppressed VSMCs proliferation and reduced aortic endothelial expression of MCP1, VCAM1, ICAM1, and PAII [37,93] and monocyte migration and macrophage activation in a NFkB-dependent manner [36]. Other observed actions are the blocking of proinflammatory monocyte aortic infiltration, the decrease in *Cd36* and *Acat1* expression, foam cell formation, LPS-induced IL-6 secretion, and MMP-9 activity [36,37,93].

2.6.3. Studies in Humans with T2DM and CVD

GIP serum levels are elevated in patients with atherosclerotic vascular disease [36]. In humans, physiological doses of GIP increased heart rate, arterial blood pressure, and blood levels of osteopontin CCL8 and CCL2, accordingly with reduced CCL2/CCR2-mediated migration of cultured human monocytes (THP-1 cells) [93].

GLP1R/GIPR co-agonist NNC0090-2746 tested in T2DM patients in a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial, administered subcutaneously once a day, showed an important effect in glycemia control and diminished body weight, cholesterol levels, and leptin [76] (Table 1). On the other hand, the dual co-agonist LY3298176 (tirzepatide) biased towards GIPR agonism obtained promising results as antidiabetic treatments in T2DM clinical trials as it showed improvements in glycemic and body weight control although is also showed an increased pulse rate [77,78,96]. Further research is needed about their cardioprotective effects, while interest in new GLP1R/GIPR co-agonists development increases [94].

3. Therapies to Inhibit Sodium-Glucose Co-Transporter 2

3.1. Structure of Sodium-Glucose Co-Transporters and Mechanism of Action

Human sodium-glucose co-transporters (SGLTs), encoded by *SLC5*, are a family of 12 secondary active glucose transporters, being the SGLT1 and SGLT2 the most important.

The core domain structure of this LeuT-superfamily is a five-helix inverted repeat motif [99,100] with a substrate-binding site in the middle of the protein and with an outer and an inner gate. Glucose adsorption by SGLT1 mostly takes place in the intestine and SGLT2 plays a key role in the renal glucose reabsorption with a highly similar sodium-coupled sugar transport mechanism.

SGLTs transport glucose across the brush-border membrane of the proximal renal tubule segments. SGLT2 mostly located in the S1 segment accounts for up to 90% of glucose reabsorption and SGLT1 in the S3 segment accounts for 10% of reabsorption [100,101]. The transport mechanism consists of Na⁺ binding to the transporter in the apical side of the epithelial cells, the opening of the external gate and glucose binding. This is followed by the closing of the external gate, the opening of the inner gate, the release of both substrates to the cytosolic side of the cell and the adoption of the ligand-free conformation [101,102]. Through the basolateral membrane of the epithelial cells, GLUT2 transporters and Na⁺/K⁺ pump alleviate the intracellular accumulation of sodium and glucose by delivering both molecules in the blood.

3.2. Development of SGLT Inhibitors

The rationale for developing SGLT2 inhibitors (SGLT2i) is the existence of up to 50 human mutations of SGLT2 resulting in renal glucosuria and important urinary glucose losses. These suggested that SGLT2i could be of use for hyperglycemic states such as T2DM patients [103].

Phlorizin, a glucoside of phloretin found in the apple tree, was the lead of the SGLT inhibitors as studies on IR diabetic rats showed that its administration subcutaneously normalized plasma glucose profiles and insulin sensitivity [104]. Because of its poor solubility, low bioavailability, and unselective SGLT1/2 inhibition, it was set aside as a therapeutic candidate. Their synthetic derivatives, T-1095A and T-1095, had better results though their clinical development did not continue because of the same limitations [103,105].

Novel molecules with a C-glycosylation modification that conferred the phlorizin resistance to hydrolysis by endogenous β -glucosidases, increasing their half-life, were developed [103]. Selective SGLT2i based on this meta-C-glycosylated diarylmethane pharmacophore led to dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin, and ertugliflozin. The gliflozins have a higher selectivity profiles for SGLT2 over SGLT1, except for sotagliflozin with a selectivity for SGLT1 of about 20:1. Sertigliflozin is another SGLT2i based on benzylphenol glucoside that did not undergo further development after phase II (<https://adisinsight.springer.com/search>). Others SGLT2i are ipragliflozin, tofogliflozin, and luseogliflozin, which are approved and available in Japan [106].

Effects of gliflozins also include actions on pancreatic islet cells and modulation of endogenous glucose production in insulin-sensitive tissues. Hence, empagliflozin treatment of T2DM subjects improved β -cell function [107], while dapagliflozin affects glucagon secretion by α -cells [108]. Moreover, T2DM patients treated with dapagliflozin and empagliflozin have shown an endogenous production of glucose and improved insulin sensitivity [107,109].

3.3. Effect of Gliflozins in Preclinical Models of CVD

Tahara et al. [110] studied different gliflozins (dapagliflozin, empagliflozin, canagliflozin, luseogliflozin, ipragliflozin, tofogliflozin) in KK/Ay T2DM mice (Table 3). The treatment with these gliflozins decreased hyperglycemia, lowered plasma levels of inflammatory mediators and improved endothelial dysfunction associated with human atherosclerosis.

Studies with empagliflozin in diabetic ZDF rats and *db/db* mice also showed an improvement of vascular stiffness and endothelial function by preventing oxidative stress, AGE-dependent signaling and inflammation [111,112]. Likewise, dapagliflozin treatment of C57BLKS/J-*lepr^{db}/lepr^{db}* mice, alleviated arterial stiffness and endothelial and VSMC

dysfunction. Interestingly, a decrease in circulating markers of inflammation and alterations in microbial richness and diversity were reported [113].

Table 3. Summary of the studies about the effect of SGLT2i in preclinical animal models and in clinical trials of T2DM patients

Drug	Animal Model	Effect on Lipids	Effect on Atherosclerosis	References
Dapagliflozin Ipragliflozin Canagliflozin Luseogliflozin Empagliflozin Tofogliflozin	KK/A ^y mice	Decreased T-Chol, TG, and NEFAs (ipragliflozin and dapagliflozin)	-Decreased ED (CAMs and E-selectin) and plasmatic inflammatory parameters	[110]
Empagliflozin	db/db mice	No change in TG and T-Chol	-Reduced aortic and endothelial cell stiffness	[111]
Empagliflozin	ZDF rats	No change in TG, T-Chol, HDL, and LDL	-Reduced oxidative stress and inflammation -ED partially prevented	[112]
Dapagliflozin	db/db mice	---	-Lower arterial stiffness -Improved ED and VSMC dysfunction	[113]
Ipragliflozin Dapagliflozin	STZ Apoe ^{-/-} mice db/db mice	No changes in TG, HDL and T-chol	-Dapagliflozin decreased macrophage infiltration, atherosclerotic lesions and plaque size -Ipragliflozin decreased foam cell formation	[114]
Dapagliflozin	Apoe ^{-/-} mice	---	-Attenuated ED and VCAMs expression -Induced vasorelaxation	[115]
Empagliflozin	Apoe ^{-/-} mice	Decreased TG and increased HDL	-Decreased atherosclerotic plaque and inflammation	[116]
Canagliflozin	Apoe ^{-/-} mice	Decreased TG, T-chol and LDL	-Increased plaque stability -Reduced atherosclerosis and inflammatory parameters	[117]
Dapagliflozin	ob/ob mice	Decreased of TG	-Reduced expression of inflammatory parameters	[118]
Drug	Trial	Structural basis	Effect on vascular and blood parameters, and MACE	References
Empagliflozin	EMPA-REG OUTCOME		-Decreased CV death (HR = 0.86), SBP and DBP -Increased HDL-C and LDL-C	[119]
Canagliflozin	CANVAS/CANVAS-R		-No effect (HR = 0.86) -Increased HDL-C and LDL-C	[120]
Canagliflozin	CREDENCE	C-glycosyl compound	-Decreased nonfatal stroke/MI and CV death (HR = 0.80)	[121]
Dapagliflozin	DECLARE-TIMI 58		-No effect (HR = 0.93) - Decreased SBP and DBP	[122]
Dapagliflozin	DEFINE-HF		-No decrease in HF (HR = 0.84)	[123]
Ertugliflozin	VERTIS-CV		-No effect (HR = 0.97) -Decreased SBP	[124]

Sotagliflozin	SCORED	-Decreased CV death (HR = 0.84)	[125]
Sotagliflozin	SOLOIST-WHF	-Decreased CV death (HR = 0.72)	[126]

CAMs: cellular adhesion molecules; CV: cardiovascular; CVD: cardiovascular disease; DBP: diastolic blood pressure; ED: endothelial dysfunction; HF: heart failure; HR: hazard ratio for three-component; HDL cholesterol; LDL-C: LDL cholesterol; MACE; MACE: major adverse cardiovascular events; MI: myocardial infarction; SBP: systolic blood pressure; T-chol: total cholesterol; TG: triglycerides; VSM: vascular smooth muscle; VCAMs: vascular cell adhesion molecules.

In vascular disease, dapagliflozin decreased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic *Apoe*^{-/-} mice, but not in non-diabetic *Apoe*^{-/-} mouse counterparts. Moreover, analysis of peritoneal macrophages from dapagliflozin-treated diabetic *Apoe*^{-/-} mice and ipragliflozin-treated *db/db* mice showed decreased cholesterol-ester accumulation, suggesting less macrophage foam cell formation capacity compared. Both SGLT2i normalized the expression of lectin-like ox-LDL receptor1 (*Lox1*), *Acat1*, and *ATP-binding cassette transporter A1 (Abca1)* in peritoneal macrophages from diabetic *Apoe*^{-/-} and *db/db* mice. These results suggested that SGLT2i exert an anti-atherogenic effect in diabetic conditions by modulating genes involved in cholesterol accumulation in macrophages [114].

Studies carried out in *Apoe*^{-/-} mice showed that dapagliflozin improved EC function without variations in plasma glucose concentrations [115] and that empagliflozin reduced plaque formation in the aortic arch and ameliorated insulin sensitivity [116]. A decrease in inflammatory mediators, like VCAM and NFκB [115] and TNFα and IL6 [116] were also observed in these studies. These results point to an atheroprotection through anti-inflammatory mechanisms. Consistently, high-fat diet fed *Apoe*^{-/-} mice, treated with canagliflozin, developed smaller and more stable plaques and displayed decreased *Vcam* and *Mcp1* expression [117].

In the T2DM mouse model, the *ob/ob* mice, dapagliflozin improved left ventricular function, attenuated activation of the Nlrp3 inflammasome and reduced inflammatory mediators by an AMPK-dependent mechanism. These changes were observed also in cardiomyofibroblasts derived from mice and were independent of the glucose-lowering effect [118].

3.4. Clinical Studies of Gliflozins in HF and CVD

In the EMPA-REG OUTCOME (NCT01131676) study, the empagliflozin treatment of patients with T2DM and CVD reduced MACE, death and hospitalization for HF. Both SBP and DBP were reduced while HDL-C and LDL-C levels were increased. However, it did not ameliorate non-fatal MI and stroke, and patients showed an increased rate of genital infection [119] (Table 3).

In the CANVAS (NCT01032629) and CANVAS-R (NCT01989754) program, canagliflozin treatment of patients with T2DM at high CV risk resulted in diminished MACE but it did not alter the occurrence of CV death or overall mortality. Like empagliflozin, it enhanced the levels of HDL-C and LDL-C and the treated patients displayed a greater risk of fractures and amputations [120].

Differences between EMPA-REG OUTCOME and CANVAS trial might be due to the study design. Thus, in the EMPA-REG all subjects had prior CV disease and additional treatments (i.e., statins, RAS inhibitors, and acetylsalicylic acid), while in the CANVAS study only 65% of patients had prior CV disease [127].

Canagliflozin tested in T2DM and albuminuric chronic kidney disease patients in the CREDENCE (NCT02065791) clinical trial, demonstrated that, besides a lower risk of cardiovascular death, MI or stroke, this drug also diminishes the risk of end-stage kidney disease without changes in the amputation and fracture rates [121].

In the DECLARE-TIMI 58 (NCT01730534) trial with T2DM and CVD patients, dapagliflozin treatment failed to reduce MACE, although the rates of cardiovascular death or hospitalization for HF were lower. In this study reductions in SBP and DBP were

described for dapagliflozin-treated patients [122]. Dapagliflozin in the DEFINE-HF (NCT02653482) trial with patients displaying chronic HF, both patients with or without T2DM, did not reduce HF determined as B-type natriuretic peptide levels [123].

Similar to dapagliflozin in the DECLARE-TIMI 58, ertugliflozin in the VERTIS CV (NCT01986881) trial, which included T2DM and CVD patients, did not reduce MACE or neither modify the death rate attributed to CV causes. However, ertugliflozin reduced SBP [124].

Two trials were carried out with sotagliflozin, the SCORED (NCT03315143) clinical trial [125] with T2DM chronic kidney disease and CVD participants, and the SOLOIST-WHF (NCT03521934) trial [126], with T2DM patients with HF. In both trials, a decrease in MACE was observed, but patients in the treatment group of the SCORED trial suffered more genital infections and volume depletion, in addition to diarrhea and hypoglycemia in both trials.

4. Lipid-Lowering Therapies based on the Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9 Inhibition

As mentioned in the introduction one main mechanism for the regulation of blood LDL-C levels relies on its clearance by LDLR located on the surface of hepatic cells. This receptor binds the apoprotein B-100 (Apo B-100) present in LDL, VLDL, and IDL particles. After LDL binding, the receptor leads to the clathrin-mediated endocytosis of the ligand-receptor complex, which finishes in LDL degradation into amino acids and cholesterol. LDLR undergoes internalization and degradation by the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9), thus playing a pivotal role in the regulation of lipoprotein clearance [128]. PCSK9 gene was identified in 2003 in a family with Familial hypercholesterolemia (FH), an autosomal dominant disease with elevated LDL-C in blood [129]. FH was attributed to two missense mutations in the coding region of the PCSK9 gene with “gain of function—GOF”, hence promoting LDLR degradation [129]. Two years later, lower plasma levels of LDL-C were associated with the existence of two “loss of function mutations—LOF” in PCSK9 that resulted in elevated LDLR concentration in hepatic cells [130,131]. All these findings pointed to PCSK9 protein inhibition as a new potential lipid-lowering therapeutic target. To reduce CVD, PCSK9 inhibition has been set as a therapy in patients with FH, in those resistant to statin treatment or in subjects that did not reach the LDL-C goal levels at maximum statin dose [132,133]. By contrary, no recommendations exist today for T2DM patients’ treatment.

4.1. Biology of PCSK9 in Lipid Metabolism and Vascular Homeostasis

PCSK9, also known as neural apoptosis-regulated convertase 1, is the ninth member of the secretory serine proteases of the subtilase family. Although it is mainly expressed by hepatocytes, PCSK9 is also present in the small intestine, kidney, pancreas, brain [128,134,135], and ischemic heart [136]. The 25-kb PCSK9 human gene on chromosome 1p32 has 12 exons and 11 introns and is under the regulation of SREBP-2 (the sterol regulatory element-binding protein) [132,135]. It encodes a 692 amino acid serine protease that is synthesized as an inactive precursor, pre-proPCSK9. The pre-proPCSK9, stored in the ER, is processed to pro-PCSK9 and this last into mature PCSK9 which is bound to a cleaved prodomain that acts as a catalytic inhibitor and chaperone until its secretion into the circulation. The prodomain-mature PCSK9 heterodimer, with a plasma half-life of 5 min, binds to high-affinity specific proteins, leading to their intracellular degradation [135].

PCSK9 function is to regulate the amount of LDLR by forming a PCSK9-LDLR complex in the hepatocyte surface which is internalized by endocytosis and engaged into endosomal-lysosomal degradation [135,137]. PCSK9 can also bind to LDLR intracellularly through a Golgi-lysosome pathway for degradation [135,138].

Recent findings indicate the participation of PCSK9 in other processes beyond lipid homeostasis such as cell cycle, apoptosis, and inflammation with a potential effect on atherosclerosis [139]. Thus, LPS upregulate PCSK9 in liver and kidney in mice, in human EC and VSMCs [140]. Consistently, the injection of LPS into *Pcsk9* deficient mice resulted in less synthesis of pro-inflammatory IL-6 and TNF α cytokines and reduced expression of adhesion molecules in ECs and VSMCs [141].

PCSK9 expression is promoted by TNF in liver and VSMCs and by oxidized LDL in ECs, macrophages, VSMCs, and DC [140,141]. In experimental atherosclerosis, PCSK9 is mostly found in VSMCs, although its expression is LDLR-dependent, as *Ldlr*^{-/-} mice do not display *Pcsk9* expression [142]. Notably, *Pcsk9* expression is localized in the artery branches with low shear stress and mirrors cytokine expression of these sites indicating a proatherogenic effect [142]. On the other hand, *Apoe*^{-/-} mice overexpressing human PCSK9 specifically in the bone marrow displayed augmented levels of proinflammatory Ly6C^{hi} monocyte infiltration in atheromas. Moreover, human PCSK9-overexpressing macrophages displayed enhanced pro-inflammatory *Tnf* and *Il1b* genes and diminished anti-inflammatory *Il10* and *Arg* genes [143]. In agreement with these, in vivo *Pcsk9* gene silencing by lentiviral transduction of *Apoe*^{-/-} mice decreased lesion size and macrophage infiltration and expression of *Nfkb*, *Tnfa*, *Il1*, and *Tlr4* in atherosclerotic plaques [144]. In macrophages, PCSK9 stimulates proinflammatory cytokine expression and foam cell formation by upregulating *Sra* and *Cd36*. Other actions of PCSK9 include activation of T cells, monocyte migration, and VSMC apoptosis [142]. Altogether indicates a role of PCSK9 in atheroma lesion development by regulating inflammatory pathways. Notwithstanding, the clinical relevance of these anti-inflammatory actions remains to be established, as patients treated with PCSK9 inhibitors (PCSK9i) do not display altered levels of the hs-CRP inflammatory marker [142].

4.2. Rational for PCSK9 Inhibition as a Potential Therapy

The main rationale for the development of PCSK9i as CVD therapy were the positive correlation between high PCSK9 levels and increased CVD risk and the association between different PCSK9 polymorphisms and vascular illness [145,146]. Moreover, the moderately-high prevalence and the lack of harmful effects of PCSK9 LOF mutations in healthy individuals suggested a high safety of a potential PCSK9 therapeutic inhibition [132,146].

On the other hand, experimental animal data also gave a foundation for the development of PCSK9i. *Pcsk9*^{-/-} mice displayed up to 80% decrease in plasma LDL-C levels due to increased hepatic LDLR and LDL clearance [147], which resulted in dramatic reductions in aortic atherosclerosis [148].

To date, up to nine PCSK9 inhibitory strategies, acting either preventing its binding to the LDLR, or its maturation, secretion, or synthesis, have been or are being developed [149]. These therapies, described below and summarized in Table 4, include the use of monoclonal antibodies (mAb) against PCSK9 [150], antisense oligonucleotides (ASOs), small interfering RNA (siRNAs), vaccines, and small molecules [151].

4.2.1. PCSK9 Monoclonal Antibodies

The only current clinical therapy to inhibit PCSK9 function in use is the administration of human mAb against soluble PCSK9. A single intravenous injection of the PCSK9 mAb, alirocumab, in hyperlipidemic *APOE*3Leiden.CETP* transgenic mice, decreased non-HDL-C, inflammatory parameters, and atherosclerosis lesion size and improved plaque stability in a dose-dependent manner [152]. Similarly, administration of a PCSK9 mAb reduced about 80% the levels of LDL-C in non-human primates [153]. An improved version of this mAb, with greater antigen affinity and resistance to degradation, achieved a reduction of around 40% in LDL-C levels at lower doses and an efficiency of 2.8 times longer [154].

Table 4. Pre-clinical and clinical trials studying PCSK9 inhibitors in the context of hypercholesterolemia

Inhibition Strategy	Animal Models	Effects on Lipids	Effects on Atherosclerosis	References
PCSK9 mAb	Cynomolgus monkeys	Decreased LDL-C (80%), T-Chol (48%)	---	[153]
PCSK9 mAb	C57BL/6 mice Cynomolgus monkeys	Decreased LDL-C (40%)	---	[154]
PCSK9 mAb: alirocumab	APOE*3Leiden.CETP mice	Decreased non-HDL-C and TGs	-Decreased inflammation and atherosclerotic lesion -Increased plaque stability	[152]
siRNA PCSK9	Cynomolgus monkeys C57BL/6 mice Sprague–Dawley rats	Decrease of LDL-C and T-Chol (60%)	---	[155]
Inhibition Strategy	Trial Name	Type of Patients	Reported Effects	References
PCSK9 mAb: evolocumab	FOURIER/OSLER [NCT01764633; NCT01439880] Phase III	Patients with atherosclerotic CVD	-Increased LDLR and HDL-C -Decreased LDL-C (61%), Total-C (36.1%), TG (12.6%), and Lp(a) (25.5%). -Increased Apolipoprotein A1 and HDL-C -Reduced CV (12–19%)	[156,157]
PCSK9 mAb: alirocumab	ODYSSEY [NCT01507831] Phase III	ACS patients	-Increased hepatic LDLR and HDL-C (4%) -Decreased LDL-C (58%), Total-C (37.8%), TG (15.6%), and Lp(a) (29.3%) and MACE -Increased ApoA1 and HDL-C -Reduced CV events (48%)	[158,159]
PCSK9 mAb: alirocumab, evolocumab	Meta-analysis	Alirocumab or evolocumab-treated patients	-Decreased nonfatal CV events and mortality. -Improved atherogenic events	[150,160]
PCSK9 siRNA: ALN-PCS	Phase I dose-escalation study [NCT01437059]	Healthy adult volunteers	-Reduced LDL-C (40%)	[161]
PCSK9 siRNA: ALN-60212 (Inclisiran).	ORION 1 Phase II: [NCT02597127] Phase III 10, 11: [NCT03399370; NCT03400800]	Patients at CVD risk with elevated LDL-C and some receiving statins	-Reduced LDL-C (52.6%) relative to base-line, as well as apoB and non-HDL-C.	[162,163]

ACS: Acute coronary syndrome; ApoA1 : Apolipoprotein A1 ; CV: cardiovascular; CVD: cardiovascular disease; HDL-C: HDL cholesterol; LDL-C: LDL cholesterol; LDLR: LDL receptor; Lp(a): lipoprotein (a); MACE : Major adverse cardiovascular events ; Total-C: total cholesterol; TG: triglycerides.

The two monoclonal antibodies approved as a PCSK9-blocking therapies are alirocumab (SAR236553/REGN727 from Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi) and evolocumab (AMG145 from Amgen). These are currently prescribed to reduce the risk of atherosclerotic CVD and lower LDL-C levels in patients with FH and resistance to statin therapy, among others [150,164]. Alirocumab is a human IgG1 mAb that strongly binds PCSK9 with a maximum effect between 8 and 15 days after its subcutaneous administration [165].

Evolocumab is a human mAb of the isotype G2 against PCSK9 with a maximum efficacy between the first and second week after subcutaneous administration [166].

Evolocumab was tested in the FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects with Elevated Risk [NCT01764633]) and OSLER (Open-label Extension Study of Evolocumab [NCT01439880]) trials [156,157], and alirocumab was evaluated in the ODYSSEY trial (Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome With Alirocumab) [158,159]. These showed increased hepatic LDLR and reduced circulating levels of LDL-C by up to 60% as well as VLDL [167]. Both alirocumab and evolocumab slightly increased HDL levels and apolipoprotein A1 and diminished plasmatic lipoprotein(a) [132]. A current meta-analysis have shown that PCSK9 antibodies reduce nonfatal cardiovascular events and all-cause mortality [156,160], improve several atherogenic events [150], and promote plaque regression [168].

Notwithstanding, the use of mAbs as PCSK9 inhibitors for CVD therapy holds several limitations, such as the high cost (about 14,500 USD per patient each year), a limited lifetime, and administration frequency of twice a month [149]. Because of this, novel approaches to pharmacologically inhibit PCSK9 are under development consisting of gene silencing either with siRNAs or by using ASOs.

4.2.2. Small Interfering RNA (siRNA)

The mechanism of action of PCSK9 gene silencing uses a duplex 20 bp RNA molecule acting as a siRNA. Within the cell, it renders an anti-sense strand that binds to the mRNA gene, generating an incomplete duplex RNA later processed by DICER [151], thus preventing PCSK9 translation and increasing LDLR protein hepatic content.

Pre-clinical trials have shown that PCSK9 gene silencing by siRNA reduced cholesterol levels in monkeys by 60% due to a 50–70% decrease in the PCSK9 mRNA levels [155]. PCSK9 siRNA suppressed the inflammatory response by diminishing the generation of ROS and LDL oxidation-induced apoptosis in ECs and macrophages, respectively [145]. In clinical trial phase I, this same PCSK9 siRNA reduced LDL-C levels by 40% [161] but the effects were not lasting and an improved version of the siRNA was developed giving rise to Inclisiran (ALN-60212 from Alnylam) [149,169]. Inclisiran has been designed for hepatic cellular internalization, does not induce immunogenic reactions, and has a greater resistance to degradation by nucleases [169]. In phase I clinical trial, intravenous injection of Inclisiran, a siRNA in a lipid nanoparticle (ALN-60212), reduced the levels of PCSK9 and LDL-C by 74.5% and 50.6% respectively, with lasting effects between 3 to 6 months and decreases in non-HDL-C and apolipoprotein B (apoB) [170]. Phase II trial ORION-1, which evaluated different Inclisiran doses in patients who had a history of atherogenic CVD or high atherosclerotic CVD-risk with elevated LDL-C levels, showed a dose-dependent decrease in PCSK9 and LDL-C levels [162]. Besides, patients who received two doses presented a reduction of 69.1% and 52.6% of PCSK9 and LDL-C [151,162], without adverse reactions [169]. Results of ORION phase III trials (ORION 10 and 11) have shown the effectivity of Inclisiran in patients with CVD, CVD risk or with elevated LDL-C levels despite statin-treatment at the maximum dose, with reductions in LDL-C, non-HDL-C, and apoB [163].

Because its potent and long-lasting effect lowering LDL-C levels, the administration frequency (once/twice per year) [149], low cost and easier long-term storage, Inclisiran holds great promise as an hypolipemiant agent.

4.3. Other Developing Approaches to PCSK9 Inhibition

Other drug strategies to inhibit PCSK9 function include the use of ASOs (antisense oligonucleotides), small-molecules inhibitors, PCSK9 vaccination or the CRISPR/Cas9 system (clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated protein 9) to lower PCSK9 concentration [151]. These approaches, in preclinical phase or phase I [150], are expected to offer a number of several additional benefits such as prolonged effects, easier production and lower cost [149]. The administration of an ASO, which is a 15–30 pb

single-strand DNA that hybridizes with *PCSK9* mRNA and ensues RNase H degradation route [164], resulted in a high specific decrease of LDL-C and *PCSK9* levels of 25–50% and 50–85%, respectively, in a phase I clinical trial [151]. Notably, berberine, a natural product obtained from a plant, and its derivatives have been shown to inhibit the transcription of *PCSK9*, and therefore it could also be useful in the management of patients with CVD risk [149,168].

5. Conclusions

The investigations reviewed here indicate that the new emergent clinical therapies designed to restore metabolic homeostasis have major effects on the cardiovascular system beyond metabolic control. In addition to their expected anti-diabetic and lipid-lowering actions, the main common mechanisms for CVD prevention and atheroprotection of the three class drugs in the studies reviewed here are a direct modulation of vascular and inflammatory cell phenotypes and an improvement of the vascular and cardiomyocyte function. These effects of the incretin-therapies, SGLT2i and PCSK9i in vascular, immune cells and cardiomyocytes have been summarized in Figure 2. These have been shown to prevent early stages of atherosclerosis such as decreased leukocyte adhesion, endothelial dysfunction, immune cell recruitment, and foam cell formation. Moreover, several animal studies also demonstrated that these strategies stabilize atheromas and diminish necrotic cores of advanced plaques. A promising future of incretin-based therapies and SGLT2i for their use in cardiovascular prevention, and possibly, the use of small molecules as PCSK9i for more affordable therapeutics, is anticipated. Notwithstanding, completion of the ongoing clinical trials and further insight about the mechanisms of action of these drugs is needed to reduce the burden of CVD in the future.

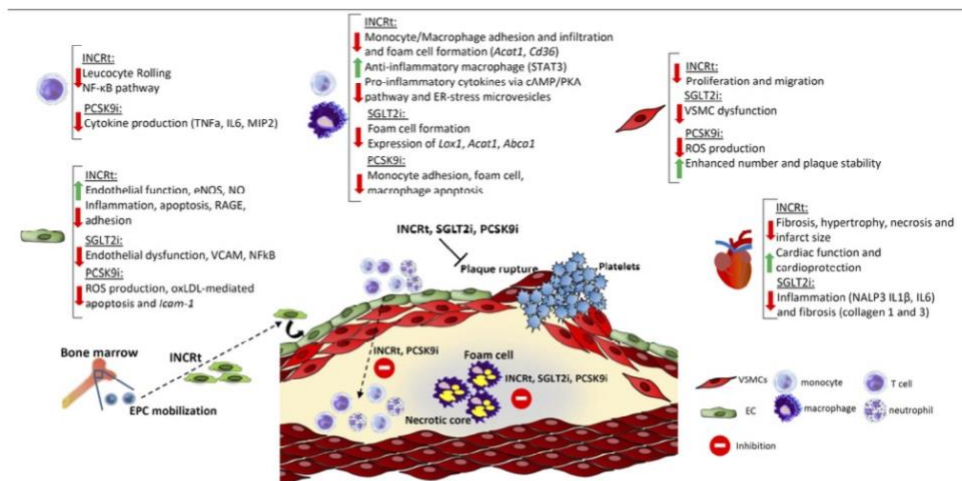


Figure 2. Common mechanism of action of incretin-therapies, SGLT2i and PCSK9i in immune and vascular cells involved in atherosclerosis progression and in cardiomyocyte function. The main protective mechanisms of PCSK9i and INCRt in T cells include the impairment of leukocyte rolling and a decrease in NFκB activation and cytokine secretion. Both PCSK9i and INCRt also reduce monocyte adhesion and recruitment while in macrophages all three class drugs decrease macrophage foam cell formation. INCRt also decreases inflammatory genes in macrophages and PCSK9i impairs restrains proatherogenic apoptosis. Endothelial function is improved by all three class drugs by several mechanisms such as enhanced eNOS, reduced adhesion of leukocytes and inflammatory molecules and diminished ROS production. Notably, INCRt also promote endothelial cell repair by the mobilization of EPC from the bone marrow. In VSMCs’ INCRt decrease proliferation and hyperplasia, PCSK9i promotes plaque stability by enhancing VSMC number, and SGLT2i reduce their dysfunction. All these mechanisms lead to a decrease in leukocyte retention in the subendothelial space, less foam cell

formation, reduced necrotic core and prevention of plaque rupture that, in patients, ensues the acute cardiovascular events. Lastly, among the actions observed in cardiomyocytes stands out the improved cardiac function by INCR1 and SGLT2i by decreasing inflammation and fibrosis and necrosis. EPC: endothelial progenitor cell; INCR1: incretin-therapies; SGLT2i: sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor; PCSK9i: proprotein convertase subtilisin kexin 9 inhibitor.

Author Contributions: M.A.-B., G.H.-G., and A.T.-C. reviewed all the literature helped to write the manuscript. A.H.-C. help to write some sections of the manuscript. S.M.-H. and H.G.-N. designed the review, supervised the literature, and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by from Carlos III Health Institute and the European Regional Development Fund (FEDER) (CB07/08/0043, PI19/00169 to H.G.-N., S.M.-H.), and JR18/00051 from Generalitat Valenciana, (GenT CDEI-04/20-B to H.G.-N.).

Data Availability Statement: Data sharing not applicable

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Naghavi, M.; Abajobir, A.A.; Abbafati, C.; Abbas, K.M.; Abd-Allah, F.; Abera, S.F.; Aboyans, V.; Adetokunboh, O.; Ämrlöv, J.; Afshin, A.; et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet* **2017**, *390*, 1151–1210. doi:10.1016/S0140-6736(17)32152-9.
- Ference, B.A.; Ginsberg, H.N.; Graham, I.; Ray, K.K.; Packard, C.J.; Bruckert, E.; Hegele, R.A.; Krauss, R.M.; Raal, F.J.; Schunkert, H.; et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1: Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **2017**, *38*, 2459–2472. doi:10.1093/eurheartj/ehx144.
- Stone, N.J.; Robinson, J.G.; Lichtenstein, A.H.; Bairey Merz, C.N.; Blum, C.B.; Eckel, R.H.; Goldberg, A.C.; Gordon, D.; Levy, D.; Lloyd-Jones, D.M.; et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 2889–2934. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.002.
- Bornfeldt, K.E. Uncomplicating the macrovascular complications of diabetes: The 2014 edwin Bierman award lecture. *Diabetes* **2015**, *64*, 2689–2697. doi:10.2337/db14-1963.
- Adeva-Andany, M.M.; Martínez-Rodríguez, J.; González-Lucán, M.; Fernández-Fernández, C.; Castro-Quintela, E. Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2019**, *13*, 1449–1455.
- Kubota, T.; Kubota, N.; Kumagai, H.; Yamaguchi, S.; Kozono, H.; Takahashi, T.; Inoue, M.; Itoh, S.; Takamoto, I.; Sasako, T.; et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 294–307. doi:10.1016/j.cmet.2011.01.018.
- Martínez-Hervás, S.; Vinué, Á.; Núñez, L.; Andrés-Blasco, I.; Piqueras, L.; TomásReal, J.; Ascaso, J.F.; Burks, D.J.; Sanz, M.J.; González-Navarro, H. Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *103*, 324–336. doi:10.1093/cvr/cvu115.
- Van Dijk, R.A.; Duiniveld, A.J.F.; Schaapherder, A.F.; Mulder-Stapel, A.; Hamming, J.F.; Kuiper, J.; de Boer, O.J.; van der Wal, A.C.; Koldogge, F.D.; Virmani, R.; et al. A change in inflammatory footprint precedes plaque instability: A systematic evaluation of cellular aspects of the adaptive immune response in human atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, doi:10.1161/JAHA.114.001403.
- Lytvyn, Y.; Bjornstad, P.; Pun, N.; Cherny, D.Z.I. New and old agents in the management of diabetic nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2016**, *25*, 232–239.
- White, W.B.; Baker, W.L. Cardiovascular effects of incretin-based therapies. *Annu. Rev. Med.* **2016**, *67*, 245–260. doi:10.1146/annurev-med-050214-013431.
- Baggio, L.L.; Drucker, D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2131–2157. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054.
- Drucker, D.J. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 153–165.
- Müller, T.D.; Finan, B.; Bloom, S.R.; D'Alessio, D.; Drucker, D.J.; Flatt, P.R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H.J.; Habener, J.F.; et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 72–130.
- Ussher, J.R.; Drucker, D.J. Cardiovascular actions of incretin-based therapies. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1788–1803.
- Lambeir, A.M.; Durinx, C.; Scharpé, S.; De Meester, I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: An update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2003**, *40*, 209–294.
- Lamers, D.; Famulla, S.; Wronkowitz, N.; Hartwig, S.; Lehr, S.; Ouwens, D.M.; Eckardt, K.; Kaufman, J.M.; Ryden, M.; Müller, S.; et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* **2011**, *60*, 1917–1925. doi:10.2337/db10-1707.
- Zhong, J.; Maiseyue, A.; Davis, S.N.; Rajagopalan, S. DPP4 in cardiometabolic disease: Recent insights from the laboratory and clinical trials of DPP4 inhibition. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1491–1504.

18. Fisman, E.Z.; Tenenbaum, A. Antidiabetic treatment with gliptins: Focus on cardiovascular effects and outcomes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 1–13, doi:10.1186/s12933-015-0294-0.
19. Röhrborn, D.; Wronkowitz, N.; Eckel, J. DPP4 in diabetes. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 386.
20. Zhong, J.; Rao, X.; Deiluisi, J.; Braunstein, Z.; Narula, V.; Hazey, J.; Mikami, D.; Needleman, B.; Satoskar, A.R.; Rajagopalan, S. A potential role for dendritic cell/macrophage-expressing DPP4 in obesity-induced visceral inflammation. *Diabetes* **2013**, *62*, 149–157, doi:10.2337/db12-0230.
21. Ikushima, H.; Munakata, Y.; Iwata, S.; Ohnuma, K.; Kobayashi, S.; Dang, N.H.; Morimoto, C. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cell. Immunol.* **2002**, *215*, 106–110, doi:10.1016/S0008-8749(02)00010-2.
22. Ghorpade, D.S.; Ozcan, L.; Zheng, Z.; Nicoloso, S.M.; Shen, Y.; Chen, E.; Blüher, M.; Czech, M.P.; Tabas, I. Hepatocyte-secreted DPP4 in obesity promotes adipose inflammation and insulin resistance HHS Public Access. *Nature* **2018**, *555*, 673–677, doi:10.1038/nature26138.
23. Sell, H.; Blüher, M.; Klötting, N.; Schlich, R.; Willems, M.; Ruppe, F.; Knoefel, W.T.; Dietrich, A.; Fielding, B.A.; Arner, P.; et al. Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: Correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 4083–4090, doi:10.2337/dc13-0496.
24. Wronkowitz, N.; Görgens, S.W.; Romacho, T.; Villalobos, L.A.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Peiró, C.; Sell, H.; Eckel, J. Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor 2. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 1613–1621, doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.004.
25. Alonso, N.; Teresa Julián, M.; Puig-Domingo, M.; Vives-Pi, M. Incretin hormones as immunomodulators of atherosclerosis. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 1–6, doi:10.3389/fendo.2012.00112.
26. Deng, X.; Tavallaie, M.S.; Sun, R.; Wang, J.; Cai, Q.; Shen, J.; Lei, S.; Fu, L.; Jiang, F. Drug discovery approaches targeting the incretin pathway. *Bioorg. Chem.* **2020**, *99*, doi:10.1016/j.bioorg.2020.103810.
27. Standl, E.; Schnell, O.; McGuire, D.K.; Ceriello, A.; Rydén, L. Integration of recent evidence into management of patients with atherosclerotic cardiovascular disease and type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2017**, *5*, 391–402.
28. McGuire, D.K.; van de Werf, F.; Armstrong, P.W.; Standl, E.; Koglin, J.; Green, J.B.; Bethel, M.A.; Cornel, J.H.; Lopes, R.D.; Halvorsen, S.; et al. Association between sitagliptin use and heart failure hospitalization and related outcomes in type 2 diabetes mellitus: Secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Cardiol.* **2016**, *1*, 126–135, doi:10.1001/jamacardio.2016.0103.
29. Scirica, B.M.; Bhatt, D.L.; Braunwald, E.; Steg, P.G.; Davidson, J.; Hirshberg, B.; Ohman, P.; Frederich, R.; Wiviott, S.D.; Hoffman, E.B.; et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 1317–1326, doi:10.1056/NEJMoa1307684.
30. Zannad, F.; Cannon, C.P.; Cushman, W.C.; Bakris, G.L.; Menon, V.; Perez, A.T.; Fleck, P.R.; Mehta, C.R.; Kupfer, S.; Wilson, C.; et al. Heart failure and mortality outcomes in patients with type 2 diabetes taking alogliptin versus placebo in EXAMINE: A multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet* **2015**, *385*, 2067–2076, doi:10.1016/S0140-6736(14)62225-X.
31. McGuire, D.K.; Alexander, J.H.; Johansen, O.E.; Perkovic, V.; Rosenstock, J.; Cooper, M.E.; Wanner, C.; Kahn, S.E.; Toto, R.D.; Zinman, B.; et al. Linagliptin effects on heart failure and related outcomes in individuals with type 2 diabetes mellitus at high cardiovascular and renal risk in CARMELINA. *Circulation* **2019**, *139*, 351–361, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038352.
32. McInnes, G.; Evans, M.; del Prato, S.; Stumvoll, M.; Schweizer, A.; Lukashovich, V.; Shao, Q.; Kothny, W. Cardiovascular and heart failure safety profile of vildagliptin: A meta-analysis of 17000 patients. *Diabetes Obes. Metab.* **2015**, *17*, 1085–1092, doi:10.1111/dom.12548.
33. Remm, F.; Franz, W.M.; Brenner, C. Gliptins and their target dipeptidyl peptidase 4: Implications for the treatment of vascular disease. *Eur. Hear. J. Cardiovasc. Pharm.* **2016**, *2*, 185–193.
34. Ervinna, N.; Mita, T.; Yasunari, E.; Azuma, K.; Tanaka, R.; Fujimura, S.; Sukmawati, D.; Nomiya, T.; Kanazawa, A.; Kawamori, R.; et al. Anagliptin, a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apo e-deficient mice. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1260–1270, doi:10.1210/en.2012-1855.
35. Nishida, S.; Matsumura, T.; Senokuchi, T.; Murakami-Nishida, S.; Ishii, N.; Morita, Y.; Yagi, Y.; Motoshima, H.; Kondo, T.; Araki, E. Inhibition of inflammation-mediated DPP-4 expression by linagliptin increases M2 macrophages in atherosclerotic lesions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *524*, 8–15, doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.027.
36. Kahles, F.; Liberman, A.; Halim, C.; Rau, M.; Möllmann, J.; Mertens, R.W.; Rückbeil, M.; Diepolder, I.; Walla, B.; Diebold, S.; et al. The incretin hormone GIP is upregulated in patients with atherosclerosis and stabilizes plaques in ApoE^{-/-} mice by blocking monocyte/macrophage activation. *Mol. Metab.* **2018**, *14*, 150–157, doi:10.1016/j.molmet.2018.05.014.
37. Nagashima, M.; Watanabe, T.; Terasaki, M.; Tomoyasu, M.; Nohtomi, K.; Kim-Kaneyama, J.; Miyazaki, A.; Hirano, T. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein e knockout mice. *Diabetologia* **2011**, *54*, 2649–2659, doi:10.1007/s00125-011-2241-2.
38. Tashiro, Y.; Sato, K.; Watanabe, T.; Nohtomi, K.; Terasaki, M.; Nagashima, M.; Hirano, T. A glucagon-like peptide-1 analog liraglutide suppresses macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Peptides* **2014**, *54*, 19–26, doi:10.1016/j.peptides.2013.12.015.
39. Bruen, R.; Curley, S.; Kajani, S.; Crean, D.; O'Reilly, M.E.; Lucitt, M.B.; Godson, C.G.; McGillicuddy, F.C.; Belton, O. Liraglutide dictates macrophage phenotype in apolipoprotein E null mice during early atherosclerosis. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, doi:10.1186/s12933-017-0626-3.

40. Yang, G.; Lei, Y.; Inoue, A.; Piao, L.; Hu, L.; Jiang, H.; Sasaki, T.; Wu, H.; Xu, W.; Yu, C.; et al. Exenatide mitigated diet-induced vascular aging and atherosclerotic plaque growth in ApoE-deficient mice under chronic stress. *Atherosclerosis* **2017**, *264*, 1–10, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.014.
41. Arakawa, M.; Mita, T.; Azuma, K.; Ebato, C.; Goto, H.; Nomiya, T.; Fujitani, Y.; Hirose, T.; Kawamori, R.; Watada, H. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes* **2010**, *59*, 1030–1037, doi:10.2337/db09-1694.
42. Wang, Y.; Parlevliet, E.T.; Geerling, J.J.; van der Tuin, S.J.L.; Zhang, H.; Bieghs, V.; Jawad, A.H.M.; Shiri-Sverdlov, R.; Bot, I.; de Jager, S.C.A.; et al. Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *Br. J. Pharm.* **2014**, *171*, 723–734, doi:10.1111/bph.12490.
43. Vinué, Á.; Navarro, J.; Herrero-Cervera, A.; García-Cubas, M.; Andrés-Blasco, I.; Martínez-Hervás, S.; Real, J.T.; Ascaso, J.F.; González-Navarro, H. The GLP-1 analogue lixisenatide decreases atherosclerosis in insulin-resistant mice by modulating macrophage phenotype. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1801–1812, doi:10.1007/s00125-017-4330-3.
44. Rakipovski, G.; Rolin, B.; Nøhr, J.; Klewe, I.; Frederiksen, K.S.; Augustin, R.; Hecksher-Sørensen, J.; Ingvorsen, C.; Pølex-Wolf, J.; Knudsen, L.B. The GLP-1 analogs liraglutide and semaglutide reduce atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLr/Mice by a mechanism that includes inflammatory pathways. *JACC Basic Transl. Sci.* **2018**, *3*, 844–857, doi:10.1016/j.jacbts.2018.09.004.
45. Shah, Z.; Kampfrath, T.; Deiluiis, J.A.; Zhong, J.; Ying, Z.; Xu, X.; Lu, B.; Moffatt-Bruce, S.; Durairaj, R.; et al. Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis. *Circulation* **2011**, *124*, 2338–2349, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041418.
46. Helmstädter, J.; Frenis, K.; Filippou, K.; Grill, A.; Dib, M.; Kalinovic, S.; Pawelke, F.; Kus, K.; Kröller-Schön, S.; Oelze, M.; et al. Endothelial GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) receptor mediates cardiovascular protection by liraglutide in mice with experimental arterial hypertension. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 145–158, doi:10.1161/atv.0000615456.97862.30.
47. Noyan-Ashraf, M.H.; Shikatani, E.A.; Schuiki, I.; Mukovozov, I.; Wu, J.; Li, R.K.; Volchuk, A.; Robinson, L.A.; Billia, F.; Drucker, D.J.; et al. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. *Circulation* **2013**, *127*, 74–85, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.091215.
48. Noyan-Ashraf, M.H.; Abdul Momen, M.; Ban, K.; Sadi, A.M.; Zhou, Y.Q.; Riazi, A.M.; Baggio, L.L.; Henkelman, R.M.; Husain, M.; Drucker, D.J. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes* **2009**, *58*, 975–983, doi:10.2337/db08-1193.
49. Wohlfart, P.; Linz, W.; Hübschle, T.; Linz, D.; Huber, J.; Hess, S.; Crowther, D.; Werner, U.; Ruetten, H. Cardioprotective effects of lixisenatide in rat myocardial ischemia-reperfusion injury studies. *J. Transl. Med.* **2013**, *11*, 84, doi:10.1186/1479-5876-11-84.
50. Hirano, T.; Mori, Y. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in experimental animals. *J. Diabetes Investig.* **2016**, *7*, 80–86, doi:10.1111/jdi.12446.
51. Li, J.; Liu, X.; Fang, Q.; Ding, M.; Li, C. Liraglutide attenuates atherosclerosis via inhibiting ER-induced macrophage derived microvesicles production in T2DM rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2017**, *9*, doi:10.1186/s13098-017-0289-y.
52. Lim, S.; Lee, G.Y.; Park, H.S.; Lee, D.H.; Jung, O.T.; Min, K.K.; Kim, Y.B.; Jun, H.S.; Chul, J.H.; Park, K.S. Attenuation of carotid neointimal formation after direct delivery of a recombinant adenovirus expressing glucagon-like peptide-1 in diabetic rats. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 183–194, doi:10.1093/cvr/cvw213.
53. Hirano, T.; Yamashita, S.; Takahashi, M.; Hashimoto, H.; Mori, Y.; Goto, M. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases macrophage infiltration and suppresses atherosclerosis in aortic and coronary arteries in cholesterol-fed rabbits. *Metabolism* **2016**, *65*, 893–903, doi:10.1016/j.metabol.2016.03.010.
54. Sudo, M.; Li, Y.; Hiro, T.; Takayama, T.; Mitsumata, M.; Shiomi, M.; Sugitani, M.; Matsumoto, T.; Hao, H.; Hirayama, A. Inhibition of plaque progression and promotion of plaque stability by glucagon-like peptide-1 receptor agonist: Serial In vivo findings from iMap-IVUS in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* **2017**, *265*, 283–291, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.920.
55. Oyama, J.I.; Higashi, Y.; Node, K. Do incretins improve endothelial function? *Cardiovasc. Diabetol.* **2014**, *13*, 21, doi:10.1186/1475-2840-13-21.
56. Huang, C.-Y.; Shih, C.-M.; Tsao, N.-W.; Lin, Y.-W.; Huang, P.-H.; Wu, S.-C.; Lee, A.-W.; Kao, Y.-T.; Chang, N.-C.; Nakagami, H.; et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves neovascularization by increasing circulating endothelial progenitor cells. *Br. J. Pharm.* **2012**, *167*, 1506–1519, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02102.x.
57. Akoumianakis, I.; Badi, I.; Douglas, G.; Chuaiphichai, S.; Herdman, L.; Akawi, N.; Margaritis, M.; Antonopoulos, A.S.; Oikonomou, E.K.; Psarros, C.; et al. Insulin-induced vascular redox dysregulation in human atherosclerosis is ameliorated by dipeptidyl peptidase 4 inhibition. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, doi:10.1126/SCITRANSLMED.AAV8824.
58. Nagamine, A.; Hasegawa, H.; Hashimoto, N.; Yamada-Inagawa, T.; Hirose, M.; Kobara, Y.; Tadokoro, H.; Kobayashi, Y.; Takano, H. The effects of DPP-4 inhibitor on hypoxia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *133*, 42–48, doi:10.1016/j.jphs.2016.12.003.
59. Chihara, A.; Tanaka, A.; Morimoto, T.; Sakuma, M.; Shimabukuro, M.; Nomiya, T.; Arasaki, O.; Ueda, S.; Node, K. Differences in lipid metabolism between anagliptin and sitagliptin in patients with type 2 diabetes on statin therapy: A secondary analysis of the REASON trial. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*, 158, doi:10.1186/s12933-019-0965-3.
60. Green, J.B.; Bethel, M.A.; Armstrong, P.W.; Buse, J.B.; Engel, S.S.; Garg, J.; Josse, R.; Kaufman, K.D.; Koglin, J.; Korn, S.; et al. Effect of sitagliptin on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 232–242,

- doi:10.1056/nejmoa1501352.
61. Rosenstock, J.; Kahn, S.E.; Johansen, O.E.; Zinman, B.; Espeland, M.A.; Woerle, H.J.; Pfarr, E.; Keller, A.; Mattheus, M.; Baanstra, D.; et al. Effect of linagliptin vs glimepiride on major adverse cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes: The Carolina randomized clinical trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2019**, *322*, 1155–1166, doi:10.1001/jama.2019.13772.
 62. Perkovic, V.; Toto, R.; Cooper, M.E.; Mann, J.F.E.; Rosenstock, J.; McGuire, D.K.; Kahn, S.E.; Marx, N.; Alexander, J.H.; Zinman, B.; et al. Effects of linagliptin on cardiovascular and kidney outcomes in people with normal and reduced kidney function: Secondary analysis of the carmelina randomized trial. *Diabetes Care* **2020**, *43*, 1803–1812, doi:10.2337/dc20-0279.
 63. Pfeffer, M.A.; Claggett, B.; Diaz, R.; Dickstein, K.; Gerstein, H.C.; Køber, L.V.; Lawson, F.C.; Ping, L.; Wei, X.; Lewis, E.F.; et al. Lixisenatide in patients with type 2 diabetes and acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 2247–2257.
 64. Holman, R.R.; Bethel, M.A.; Mentz, R.J.; Thompson, V.P.; Lokhnygina, Y.; Buse, J.B.; Chan, J.C.; Choi, J.; Gustavson, S.M.; Iqbal, N.; et al. Effects of once-weekly exenatide on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1228–1239, doi:10.1056/nejmoa1612917.
 65. Angelyn Bethel, M.; Mentz, R.J.; Merrill, P.; Buse, J.B.; Chan, J.C.; Goodman, S.G.; Iqbal, N.; Jakuboniene, N.; Katona, B.; Lokhnygina, Y.; et al. Microvascular and cardiovascular outcomes according to renal function in patients treated with once-weekly exenatide: Insights from the EXSCEL trial. *Diabetes Care* **2020**, *43*, doi:10.2337/dc19-1065.
 66. Marso, S.P.; Daniels, G.H.; Frandsen, K.B.; Kristensen, P.; Mann, J.F.E.; Nauck, M.A.; Nissen, S.E.; Pocock, S.; Poulter, N.R.; Ravn, L.S.; et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 311–322, doi:10.1056/NEJMoa1603827.
 67. Verma, S.; Bhatt, D.L.; Bain, S.C.; Buse, J.B.; Mann, J.F.E.; Marso, S.P.; Nauck, M.A.; Poulter, N.R.; Pratley, R.E.; Zinman, B.; et al. Effect of liraglutide on cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus and polyvascular disease results of the LEADER trial. *Circulation* **2018**, *137*, 2179–2183, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033898.
 68. Verma, S.; Poulter, N.R.; Bhatt, D.L.; Bain, S.C.; Buse, J.B.; Leiter, L.A.; Nauck, M.A.; Pratley, R.E.; Zinman, B.; Ørsted, D.D.; et al. Effects of liraglutide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus with or without history of myocardial infarction or stroke: Post hoc analysis from the leader trial. *Circulation* **2018**, *138*, 2884–2894, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034516.
 69. Nauck, M.A.; Tornøe, K.; Rasmussen, S.; Treppendahl, M.B.; Marso, S.P. Cardiovascular outcomes in patients who experienced a myocardial infarction while treated with liraglutide versus placebo in the LEADER trial. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2018**, *15*, 465–468, doi:10.1177/1479164118783935.
 70. Mann, J.F.E.; Ørsted, D.D.; Brown-Frandsen, K.; Marso, S.P.; Poulter, N.R.; Rasmussen, S.; Tornøe, K.; Zinman, B.; Buse, J.B. Liraglutide and renal outcomes in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 839–848, doi:10.1056/nejmoa1616011.
 71. Marso, S.P.; Bain, S.C.; Consoli, A.; Eliaschewitz, F.G.; Jodar, E.; Leiter, L.A.; Lingvay, L.; Rosenstock, J.; Seufert, J.; Warren, M.L.; et al. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1834–1844, doi:10.1056/NEJMoa1607141.
 72. Husain, M.; Birkenfeld, A.L.; Donsmark, M.; Dungan, K.; Eliaschewitz, F.G.; Franco, D.R.; Jeppesen, O.K.; Lingvay, L.; Mosenzon, O.; Pedersen, S.D.; et al. Oral semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 841–851, doi:10.1056/nejmoa1901118.
 73. Hernandez, A.F.; Green, J.B.; Janmohamed, S.; D’Agostino, R.B.; Granger, C.B.; Jones, N.P.; Leiter, L.A.; Rosenberg, A.E.; Simon, K.N.; Somerville, M.C.; et al. Albiglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease (Harmony Outcomes): A double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **2018**, *392*, 1519–1529, doi:10.1016/S0140-6736(18)32261-X.
 74. Gerstein, H.C.; Colhoun, H.M.; Dagenais, G.R.; Diaz, R.; Lakshmanan, M.; Pais, P.; Probstfield, J.; Riesenmeyer, J.S.; Riddle, M.C.; Rydén, L.; et al. Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): A double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **2019**, *394*, 121–130, doi:10.1016/S0140-6736(19)31149-3.
 75. Dagenais, G.R.; Rydén, L.; Leiter, L.A.; Lakshmanan, M.; Dyal, L.; Probstfield, J.L.; Atisso, C.M.; Shaw, J.E.; Conget, I.; Cushman, W.C.; et al. Total cardiovascular or fatal events in people with type 2 diabetes and cardiovascular risk factors treated with dulaglutide in the REWIND trial: A post hoc analysis. *Cardiovasc. Diabetol.* **2020**, *19*, 199, doi:10.1186/s12933-020-01179-1.
 76. Frias, J.P.; Bastyr, E.J.; Vignati, L.; Tschöp, M.H.; Schmitt, C.; Owen, K.; Christensen, R.H.; DiMarchi, R.D. The sustained effects of a dual GIP/GLP-1 receptor agonist, NNC0090-2746, in patients with type 2 diabetes. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 343–352, doi:10.1016/j.cmet.2017.07.011.
 77. Frias, J.P.; Nauck, M.A.; Van, J.; Kutner, M.E.; Cui, X.; Benson, C.; Urva, S.; Gimeno, R.E.; Milicevic, Z.; Robins, D.; et al. Efficacy and safety of LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist, in patients with type 2 diabetes: A randomised, placebo-controlled and active comparator-controlled phase 2 trial. *Lancet* **2018**, *392*, 2180–2193, doi:10.1016/S0140-6736(18)32260-8.
 78. Coskun, T.; Sloop, K.W.; Loghin, C.; Alsina-Fernandez, J.; Urva, S.; Bokvist, K.B.; Cui, X.; Briere, D.A.; Cabrera, O.; Roell, W.C.; et al. LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: From discovery to clinical proof of concept. *Mol. Metab.* **2018**, *18*, 3–14, doi:10.1016/j.molmet.2018.09.009.
 79. Drucker, D.J. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-Like Peptide-1. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 740–756, doi:10.1016/j.cmet.2018.03.001.
 80. Baggio, L.L.; Drucker, D.J. Harnessing the Therapeutic Potential of Glucagon-Like Peptide-1: A Critical Review. *Treat Endocrinol.* **2002**, *1*, 117–25, doi:10.2165/00024677-200201020-00005.
 81. Aroda, V.R. A Review of GLP-1 Receptor Agonists: Evolution and Advancement, Through the Lens of Randomised Controlled

- Trials. *Diabetes Obes Metab*, **2018**, *Suppl 1*, pp. 22–33. doi:10.1111/dom.13162.
82. Knudsen, L.B.; Lau, J. The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. *Front Endocrinol*, **2019**, *10*, p. 155. doi:10.3389/fendo.2019.00155
 83. Eng, J.; Kleinman, W.A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J.P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7402–7405.
 84. Nauck, M.A.; Quast, D.R.; Wefers, J.; Meier, J.J. GLP-1 Receptor Agonists in the Treatment of type 2 Diabetes—State-of-the-Art. *Mol. Metab.* **2020**, *101*–102. doi:10.1016/j.molmet.2020.101102.
 85. Deacon, C.F.; Knudsen, L.B.; Madsen, K.; Wiberg, F.C.; Jacobsen, O.; Holst, J.J. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* **1998**, *41*, 271–278. doi:10.1007/s001250050903.
 86. Knudsen, J.G.; Hamilton, A.; Ramracheya, R.; Tarasov, A.I.; Brereton, M.; Haythorne, E.; Chibalina, M.V.; Spégel, P.; Mulder, H.; Zhang, Q.; et al. Dysregulation of glucagon secretion by hyperglycemia-induced sodium-dependent reduction of ATP production. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 430–442. doi:10.1016/j.cmet.2018.10.003.
 87. Gaspari, T.; Welungoda, I.; Widdop, R.E.; Simpson, R.W.; Dear, A.E. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE/mouse model. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2013**, *10*, 353–360. doi:10.1177/1479164113481817.
 88. Shiraishi, D.; Fujiwara, Y.; Komohara, Y.; Mizuta, H.; Takeya, M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *425*, 304–308. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.086.
 89. Ding, L.; Zhang, J. Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharm. Sin.* **2012**, *33*, 75–81. doi:10.1038/aps.2011.149.
 90. Dai, Y.; Mehta, J.L.; Chen, M. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelin-1 in endothelial cell by repressing nuclear factor-kappa B activation. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2013**, *27*, 371–380. doi:10.1007/s10557-013-6463-z.
 91. Krasner, N.M.; Ido, Y.; Ruderman, N.B.; Cacicedo, J.M. Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. *PLoS ONE* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0097554.
 92. Erdogdu, Ö.; Eriksson, L.; Nyström, T.; Sjöholm, Å.; Zhang, Q. Exendin-4 restores glucolipotoxicity-induced gene expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *419*, 790–795. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.106.
 93. Mori, Y.; Matsui, T.; Hirano, T.; Yamagishi, S.I. Gip as a potential therapeutic target for atherosclerotic cardiovascular disease—a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8–10. doi:10.3390/ijms21041509.
 94. Finan, B.; Ma, T.; Ottaway, N.; Müller, T.D.; Habegger, K.M.; Heppner, K.M.; Kirchner, H.; Holland, J.; Hembree, J.; Raver, C.; et al. Unimolecular dual incretins maximize metabolic benefits in rodents, monkeys, and humans. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, doi:10.1126/scitranslmed.3007218.
 95. Sachs, S.; Niu, L.; Geyer, P.; Jall, S.; Kleinert, M.; Feuchtinger, A.; Stemmer, K.; Brielmeier, M.; Finan, B.; DiMarchi, R.D.; et al. Plasma proteome profiles treatment efficacy of incretin dual agonism in diet-induced obese female and male mice. *Diabetes Obes. Metab.* **2020**, doi:10.1111/dom.14215.
 96. Khoo, B.; Tan, T.M.M. Combination gut hormones: Prospects and questions for the future of obesity and diabetes therapy. *J. Endocrinol.* **2020**, *246*, R65–R74.
 97. Yamagishi, S.I.; Fukami, K.; Matsui, T. Crosstalk between advanced glycation end products (AGEs)-receptor RAGE axis and dipeptidyl peptidase-4-incretin system in diabetic vascular complications. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 1–12.
 98. Nogi, Y.; Nagashima, M.; Terasaki, M.; Nohtomi, K.; Watanabe, T.; Hirano, T. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide prevents the progression of macrophage-driven atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0035683.
 99. Watanabe, A.; Choe, S.; Chaptal, V.; Rosenberg, J.M.; Wright, E.M.; Grabe, M.; Abramson, J. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* **2010**, *468*, 988–991. doi:10.1038/nature09580.
 100. Wright, E.M.; Loo, D.D.F.L.; Hirayama, B.A. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 733–794. doi:10.1152/physrev.00055.2009.
 101. Ghezzi, C.; Loo, D.D.F.; Wright, E.M. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia* **2018**, *61*, 2087–2097.
 102. Bakris, G.L.; Fonseca, V.A.; Sharma, K.; Wright, E.M. Renal sodium-glucose transport: Role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 1272–1277.
 103. Rieg, T.; Vallon, V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. *Diabetologia* **2018**, *61*, 2079–2086.
 104. Rossetti, L.; Smith, D.; Shulman, G.I.; Papachristou, D.; DeFronzo, R.A. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissues sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin. Investig.* **1987**, *79*, 1510–1515. doi:10.1172/JCI112981.
 105. Oku, A.; Ueta, K.; Arakawa, K.; Ishihara, T.; Nawano, M.; Kuronuma, Y.; Matsumoto, M.; Saito, A.; Tsujihara, K.; Anai, M.; et al. T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes. *Diabetes* **1999**, *48*, 1794–1800. doi:10.2337/diabetes.48.9.1794.
 106. Brown, E.; Rajeev, S.P.; Cuthbertson, D.J.; Wilding, J.P.H. A review of the mechanism of action, metabolic profile and hemodynamic effects of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors. *Diabetes Obes. Metab.* **2019**, *21*, 9–18.
 107. Ferrannini, E.; Muscelli, E.; Frascerra, S.; Baldi, S.; Mari, A.; Heise, T.; Broedl, U.C.; Woerle, H.J. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 499–508. doi:10.1172/JCI72227.

108. Bonner, C.; Kerr-Conte, J.; Gmyr, V.; Queniat, G.; Moerman, E.; Thévenet, J.; Beaucamps, C.; Delalleau, N.; Popescu, I.; Malaisse, W.J.; et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 512–517, doi:10.1038/nm.3828.
109. Merovci, A.; Solis-Herrera, C.; Daniele, G.; Eldor, R.; Vanessa Fiorentino, T.; Tripathy, D.; Xiong, J.; Perez, Z.; Norton, L.; Abdul-Ghani, M.A.; et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 509–514, doi:10.1172/JCI70704.
110. Tahara, A.; Takasu, T.; Yokono, M.; Imamura, M.; Kurosaki, E. Characterization and comparison of SGLT2 inhibitors: Part 3. Effects on diabetic complications in type 2 diabetic mice. *Eur. J. Pharm.* **2017**, *809*, 163–171, doi:10.1016/j.ejphar.2017.05.019.
111. Aroor, A.R.; Das, N.A.; Carpenter, A.J.; Habibi, J.; Jia, G.; Ramirez-Perez, F.I.; Martinez-Lemus, L.; Manrique-Acevedo, C.M.; Hayden, M.R.; Duta, C.; et al. Glycemic control by the SGLT2 inhibitor empagliflozin decreases aortic stiffness, renal resistivity index and kidney injury. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, doi:10.1186/s12933-018-0750-8.
112. Steven, S.; Oelze, M.; Hanf, A.; Kröller-Schön, S.; Kashani, F.; Roohani, S.; Welschof, P.; Kopp, M.; Gödtel-Armbrust, U.; Xia, N.; et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 370–385, doi:10.1016/j.redox.2017.06.009.
113. Lee, D.M.; Battson, M.L.; Jarrell, D.K.; Hou, S.; Ecton, K.E.; Weir, T.L.; Gentile, C.L. SGLT2 inhibition via dapagliflozin improves generalized vascular dysfunction and alters the gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 62, doi:10.1186/s12933-018-0708-x.
114. Terasaki, M.; Hiromura, M.; Mori, Y.; Kohashi, K.; Nagashima, M.; Kushima, H.; Watanabe, T.; Hirano, T. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0143396.
115. Gaspari, T.; Spizzo, L.; Liu, H.; Hu, Y.; Simpson, R.W.; Widdop, R.E.; Dear, A.E. Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2018**, *15*, 64–73, doi:10.1177/1479164117733626.
116. Han, J.H.; Oh, T.J.; Lee, G.; Maeng, H.J.; Lee, D.H.; Kim, K.M.; Choi, S.H.; Jang, H.C.; Lee, H.S.; Park, K.S.; et al. The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice fed a western diet. *Diabetologia* **2017**, *60*, 364–376, doi:10.1007/s00125-016-4158-2.
117. Nasiri-Ansari, N.; Dimitriadis, G.K.; Agrogiannis, G.; Perrea, D.; Kostakis, I.D.; Kaltsas, G.; Papavassiliou, A.G.; Randeve, H.S.; Kassi, E.; Nasiri-Ansari, N.; et al. Canagliflozin attenuates the progression of atherosclerosis and inflammation process in APOE knockout mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 106, doi:10.1186/s12933-018-0749-1.
118. Ye, Y.; Bajaj, M.; Yang, H.C.; Perez-Polo, J.R.; Birnbaum, Y. SGLT-2 Inhibition with dapagliflozin reduces the activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and attenuates the development of diabetic cardiomyopathy in mice with type 2 diabetes. Further augmentation of the effects with saxagliptin, a DPP4 inhibitor. *Cardiovasc. Drugs* **2017**, *31*, 119–132, doi:10.1007/s10557-017-6725-2.
119. Zinman, B.; Wanner, C.; Lachin, J.M.; Fitchett, D.; Bluhmki, E.; Hantel, S.; Mattheus, M.; Devins, T.; Johansen, O.E.; Woerle, H.J.; et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 2117–2128, doi:10.1056/NEJMoa1504720.
120. Neal, B.; Perkovic, V.; Mahaffey, K.W.; de Zeeuw, D.; Fulcher, G.; Erondu, N.; Shaw, W.; Law, G.; Desai, M.; Matthews, D.R. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 644–657, doi:10.1056/NEJMoa1611925.
121. Perkovic, V.; Jardine, M.J.; Neal, B.; Bompoint, S.; Heerspink, H.J.L.; Charytan, D.M.; Edwards, R.; Agarwal, R.; Bakris, G.; Bull, S.; et al. Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 2295–2306.
122. Wiviott, S.D.; Raz, I.; Bonaca, M.P.; Mosenzon, O.; Kato, E.T.; Cahn, A.; Silverman, M.G.; Zelniker, T.A.; Kuder, J.F.; Murphy, S.A.; et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 347–357.
123. Nassif, M.E.; Windsor, S.; Tang, F.; Khariton, Y.; Husain, M.; Inzucchi, S.; McGuire, D.; Pitt, B.; Scirica, B.; Austin, B.; et al. Dapagliflozin effects on biomarkers, symptoms, and functional status in patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Circulation* **2019**, *140*, 1463–1476, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042929.
124. Cannon, C.P.; Pratley, R.; Dagogo-Jack, S.; Mancuso, J.; Huyck, S.; Masiukiewicz, U.; Charbonnel, B.; Frederich, R.; Gallo, S.; Cosentino, F.; et al. Cardiovascular outcomes with ertugliflozin in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1425–1435, doi:10.1056/nejmoa2004967.
125. Bhatt, D.L.; Szarek, M.; Pitt, B.; Cannon, C.P.; Leiter, L.A.; McGuire, D.K.; Lewis, J.B.; Riddle, M.C.; Inzucchi, S.E.; Kosiborod, M.N.; et al. Sotagliflozin in patients with diabetes and chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **2020**, doi:10.1056/nejmoa2030186.
126. Bhatt, D.L.; Szarek, M.; Steg, P.G.; Cannon, C.P.; Leiter, L.A.; McGuire, D.K.; Lewis, J.B.; Riddle, M.C.; Voors, A.A.; Metra, M.; et al. Sotagliflozin in patients with diabetes and recent worsening heart failure. *N. Engl. J. Med.* **2020**, doi:10.1056/nejmoa2030183.
127. Bailey, C.J.; Marx, N. Cardiovascular protection in type 2 diabetes: Insights from recent outcome trials. *DiabetesObes. Metab.* **2019**, *21*, 3–14.
128. Seidah, N.G.; Awan, Z.; Chrétien, M.; Mbikay, M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1022–1036, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301621.
129. Abifadel, M.; Varret, M.; Rabès, J.P.; Allard, D.; Ouguerram, K.; Devillers, M.; Cruaud, C.; Benjannet, S.; Wickham, L.; Erlich, D.; et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 154–156,

- doi:10.1038/ng1161.
130. Cohen, J.; Pertsemlidis, A.; Kotowski, I.K.; Graham, R.; Garcia, C.K.; Hobbs, H.H. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 161–165, doi:10.1038/ng1509.
 131. Cohen, J.C.; Boerwinkle, E.; Mosley, T.H.; Hobbs, H.H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 1264–1272, doi:10.1056/nejmoa054013.
 132. Stoeckenbroek, R.M.; Lambert, G.; Cariou, B.; Hovingh, G.K. Inhibiting PCSK9—biology beyond LDL control. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *15*, 52–62, doi:10.1038/s41574-018-0110-5.
 133. Seidah, N.G.; Prat, A.; Pirillo, A.; Catapano, A.L.; Danilo Norata, G. Novel strategies to target proprotein convertase subtilisin kexin 9: Beyond monoclonal antibodies. *Cardiovasc. Pathol.* **2019**, *115*, 510–519, doi:10.1093/cvr/cvz003.
 134. Seidah, N.G.; Benjannet, S.; Wickham, L.; Marcinkiewicz, J.; Bélanger Jasmin, S.; Stifani, S.; Basak, A.; Prat, A.; Chrétien, M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 928–933, doi:10.1073/pnas.0335507100.
 135. Shapiro, M.D.; Tavori, H.; Fazio, S. PCSK9 from basic science discoveries to clinical trials. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 1420–1438.
 136. Ding, Z.; Wang, X.; Liu, S.; Shahanaawaz, J.; Theus, S.; Fan, Y.; Deng, X.; Zhou, S.; Mehta, J.L. PCSK9 expression in the ischemic heart and its relationship to infarct size, cardiac function, and development of autophagy. *Cardiovasc. Res.* **2018**, *114*, 1738–1751, doi:10.1093/cvr/cvy128.
 137. Seidah, N.G.; Prat, A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 367–383, doi:10.1038/nrd3699.
 138. Lagace, T.A. PCSK9 and LDLR degradation: Regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, *25*, 387–393.
 139. Lan, H.; Pang, L.; Smith, M.M.; Levitan, D.; Ding, W.; Liu, L.; Shan, L.; Shah, V.V.; Laverty, M.; Arreaza, G.; et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) affects gene expression pathways beyond cholesterol metabolism in liver cells. *J. Cell. Physiol.* **2010**, *224*, 273–281, doi:10.1002/jcp.22130.
 140. Tang, Z.H.; Li, T.H.; Peng, J.; Zheng, J.; Li, T.T.; Liu, L.S.; Jiang, Z.S.; Zheng, X.L. PCSK9: A novel inflammation modulator in atherosclerosis? *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 2345–2355, doi:10.1002/jcp.27254.
 141. Ding, Z.; Liu, S.; Wang, X.; Deng, X.; Fan, Y.; Shahanaawaz, J.; Reis, R.J.S.; Varughese, K.L.; Sawamura, T.; Mehta, J.L. Cross-Talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *107*, 556–567, doi:10.1093/cvr/cvv178.
 142. Ding, Z.; Pothineni, N.V.K.; Goel, A.; Lüscher, T.F.; Mehta, J.L. PCSK9 and inflammation: Role of shear stress, pro-inflammatory cytokines, and LOX-1. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 908–915.
 143. Giunzioni, I.; Tavori, H.; Covarrubias, R.; Major, A.S.; Ding, L.; Zhang, Y.; Devay, R.M.; Hong, L.; Fan, D.; Predazzi, I.M.; et al. Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion. *J. Pathol.* **2016**, *238*, 52–62, doi:10.1002/path.4630.
 144. Tang, Z.H.; Peng, J.; Ren, Z.; Yang, J.; Li, T.T.; Li, T.H.; Wang, Z.; Wei, D.H.; Liu, L.S.; Zheng, X.L.; et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF- κ B pathway. *Atherosclerosis* **2017**, *262*, 113–122, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.023.
 145. Guo, Y.; Yan, B.; Gui, Y.; Tang, Z.; Tai, S.; Zhou, S.; Zheng, X.L. Physiology and role of PCSK9 in vascular disease: Potential impact of localized PCSK9 in vascular wall. *J. Cell. Physiol.* **2020**, doi:10.1002/jcp.30025.
 146. Urban, D.; Pöss, J.; Böhm, M.; Laufs, U. Targeting the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *62*, 1401–1408.
 147. Rashid, S.; Curtis, D.E.; Garuti, R.; Anderson, N.H.; Bashmakov, Y.; Ho, Y.K.; Hammer, R.E.; Moon, Y.A.; Horton, J.D. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5374–5379, doi:10.1073/pnas.0501652102.
 148. Denis, M.; Marcinkiewicz, J.; Zaid, A.; Gauthier, D.; Poirier, S.; Lazure, C.; Seidah, N.G.; Prat, A. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* **2012**, *125*, 894–901, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.057406.
 149. Xu, S.; Luo, S.; Zhu, Z.; Xu, J. Small Molecules as Inhibitors of PCSK9: Current Status and Future Challenges. *Eur J Med Chem*, **2019**, *162*, 212–233. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.11.011
 150. Warden, B.A.; Fazio, S.; Shapiro, M.D. The PCSK9 Revolution: Current Status, Controversies and Future Directions: The PCSK9 Revolution. *Trends Cardiovasc Med*, **2020**, *30*, 179–185. doi: 10.1016/j.tcm.2019.05.007.
 151. Nishikido, T.; Ray, K.K. Non-antibody approaches to proprotein convertase subtilisin kexin 9 inhibition: siRNA, antisense oligonucleotides, adnectins, vaccination, and new attempts at small-molecule inhibitors based on new discoveries. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *5*, doi:10.3389/fcvm.2018.00199.
 152. Kühnast, S.; van der Hoorn, J.W.A.; Pieterman, E.J.; van den Hoek, A.M.; Sasiela, W.J.; Gusarova, V.; Peyman, A.; Schäfer, H.L.; Schwahn, U.; Jukema, J.W.; et al. Alirocumab inhibits atherosclerosis, improves the plaque morphology, and enhances the effects of a statin. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 2103–2112, doi:10.1194/jlr.M051326.
 153. Chan, J.C.Y.; Piper, D.E.; Cao, Q.; Liu, D.; King, C.; Wang, W.; Tang, J.; Liu, Q.; Higbee, J.; Xia, Z.; et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9820–9825, doi:10.1073/pnas.0903849106.
 154. Chaparro-Riggers, J.; Liang, H.; deVay, R.M.; Bai, L.; Sutton, J.E.; Chen, W.; Geng, T.; Lindquist, K.; Casas, M.G.; Boustany, L.M.; et al. Increasing serum half-life and extending cholesterol lowering in vivo by engineering antibody with pH-sensitive binding to PCSK9. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 11090–11097, doi:10.1074/jbc.M111.319764.

155. Frank-Kamenetsky, M.; Grefhorst, A.; Anderson, N.N.; Racie, T.S.; Bramlage, B.; Akinc, A.; Butler, D.; Charisse, K.; Dorkin, R.; Fan, Y.; et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11915–11920, doi:10.1073/pnas.0805434105.
156. Sabatine, M.S.; Giugliano, R.P.; Wiviott, S.D.; Raal, F.J.; Blom, D.J.; Robinson, J.; Ballantyne, C.M.; Somaratne, R.; Legg, J.; Wasserman, S.M.; et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1500–1509, doi:10.1056/NEJMoa1500858.
157. 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. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1713–1722, doi:10.1056/nejmoa1615664.
158. Schwartz, G.G.; Steg, P.G.; Szarek, M.; Bhatt, D.L.; Bittner, V.A.; Diaz, R.; Edelberg, J.M.; Goodman, S.G.; Hanotin, C.; Harrington, R.A.; et al. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2097–2107, doi:10.1056/nejmoa1801174.
159. Robinson, J.G.; Farnier, M.; Krempf, M.; Bergeron, J.; Luc, G.; Averna, M.; Stroes, E.S.; Langslet, G.; Raal, F.J.; el Shahawy, M.; et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1489–1499, doi:10.1056/NEJMoa1501031.
160. Steg, P.G.; Szarek, M.; Bhatt, D.L.; Bittner, V.A.; Brégaault, M.F.; Dalby, A.J.; Diaz, R.; Edelberg, J.M.; Goodman, S.G.; Hanotin, C.; et al. Effect of alirocumab on mortality after acute coronary syndromes: An analysis of the ODYSSEY OUTCOMES randomized clinical trial. *Circulation* **2019**, *140*, 103–112, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038840.
161. Fitzgerald, K.; Frank-Kamenetsky, M.; Shulga-Morskaya, S.; Liebow, A.; Bettencourt, B.R.; Sutherland, J.E.; Hutabarat, R.M.; Clausen, V.A.; Karsten, V.; Cehelsky, J.; et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: A randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* **2014**, *383*, 60–68, doi:10.1016/S0140-6736(13)61914-5.
162. Ray, K.K.; Landmesser, U.; Leiter, L.A.; Kallend, D.; Dufour, R.; Karakas, M.; Hall, T.; Troquay, R.P.T.; Turner, T.; Visseren, F.L.J.; et al. Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1430–1440, doi:10.1056/NEJMoa1615758.
163. Ray, K.K.; Wright, R.S.; Kallend, D.; Koenig, W.; Leiter, L.A.; Raal, F.J.; Bisch, J.A.; Richardson, T.; Jaros, M.; Wijngaard, P.L.J.; et al. Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1507–1519, doi:10.1056/nejmoa1912387.
164. Blanchard, V.; Khantalina, L.; Ramin-Mangata, S.; Chémello, K.; Nativel, B.; Lambert, G. PCSK9: From biology to clinical applications. *Pathology* **2019**, *51*, 177–183, doi:10.1016/j.pathol.2018.10.012.
165. Tomlinson, B.; Hu, M.; Zhang, Y.; Chan, P.; Liu, Z.M. Alirocumab for the treatment of hypercholesterolemia. *Expert Opin. Biol.* **2017**, *17*, 633–643, doi:10.1080/14712598.2017.1305354.
166. Kasichayanula, S.; Grover, A.; Emery, M.G.; Gibbs, M.A.; Somaratne, R.; Wasserman, S.M.; Gibbs, J.P. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of evolocumab, a PCSK9 inhibitor. *Clin. Pharm.* **2018**, *57*, 769–779, doi:10.1007/s40262-017-0620-7.
167. Reyes-Soffer, G.; Pavlyha, M.; Ngai, C.; Thomas, T.; Holleran, S.; Ramakrishnan, R.; Karmally, W.; Nandakumar, R.; Fontanez, N.; Obunike, J.; et al. Effects of PCSK9 inhibition with alirocumab on lipoprotein metabolism in healthy humans. *Circulation* **2017**, *135*, 352–362, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025253.
168. Ogura, M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. *J. Cardiol.* **2018**, *71*, 1–7, doi:10.1016/j.jjcc.2017.07.002.
169. Stoekenbroek, R.M.; Kallend, D.; Wijngaard, P.L.; Kastelein, J.J. Inclisiran for the treatment of cardiovascular disease: The ORION clinical development program. *Future Cardiol.* **2018**, *14*, 433–442, doi:10.2217/fca-2018-0067.
170. Fitzgerald, K.; White, S.; Borodovsky, A.; Bettencourt, B.R.; Strahs, A.; Clausen, V.; Wijngaard, P.; Horton, J.D.; Taubel, J.; Brooks, A.; et al. A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 41–51, doi:10.1056/NEJMoa1609243.

