



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**Estudio de la función mitocondrial, la autofagia y la mitofagia
en la diabetes de tipo 2, efecto de nanopartículas con
capacidad antioxidante y metformina: implicaciones clínicas**

Tesis doctoral

Programa de doctorado en fisiología

Presentada por:

Pedro Díaz Pozo

Dirigida por:

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Dra. Milagros Rocha Barajas

Valencia, julio 2024

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

Facultad de Medicina y Odontología.

Departamento de Fisiología.

Universitat de València

Doctorando

Pedro Díaz Pozo

Grado en biotecnología

Universidad Politécnica de Valencia

Máster en Investigación y Uso Racional del Medicamento

Universitat de València

Directores

Dr. Víctor Manuel Víctor González

Investigador en FISABIO - Profesor Titular en la Universidad de Valencia

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Dra. Milagros Rocha Barajas

Investigadora Senior en FISABIO

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Con la colaboración de:

Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

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

Facultad de Medicina — Escuela Icahn de Medicina en Monte Sinaí

Publicado en Valencia, 2024.

Dr. Víctor Manuel Víctor González, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia e Investigador en la Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Dra. Milagros Rocha Barajas, Investigadora Senior en la Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) – Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “Estudio de la función mitocondrial, la autofagia y la mitofagia en la diabetes de tipo 2, efecto de nanopartículas con capacidad antioxidante y metformina: implicaciones clínicas”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Pedro Díaz Pozo, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia en julio de 2024.

Fdo. Dr. Víctor Manuel Víctor González

Fdo. Dra. Milagros Rocha Barajas

FINANCIACIÓN

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario doctor Peset, perteneciente a la Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica de la comunidad Valenciana (FISABIO). Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a las siguientes fuentes de financiación:

- Contrato de Investigador Predoctoral en régimen de concurrencia competitiva, con cargo a la Subvención del programa ACIF de la Conselleria de Educación, Cultura y Deporte de la Generalitat Valenciana, con código ACIF/2020/370.
- Subvenciones para estancias de contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunitat Valenciana (BEFPI) de la Conselleria de Innovación, Universidad, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana, con código CIBAFP/2021/45 y CIBAFP/2022/34
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2019 - Proyectos de Investigación en Salud- “Estudio de la función mitocondrial, la autofagia y la mitofagia en la diabetes tipo 2: relación con las complicaciones cardiovasculares e implicaciones clínicas.” con referencia PI19/00838, y cuyo Investigador Principal es Dr. Víctor Manuel Víctor González, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2020 hasta el 31/12/2022.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por el Instituto de Salud Carlos III en la Convocatoria AES 2019 - Proyectos de Investigación en Salud- “Efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico sobre la activación de los leucocitos y la diversidad del microbioma oral en pacientes con resistencia a la insulina: un enfoque de sexo y género.” con referencia PI19/00437, y cuya Investigadora Principal Dra. Milagros Rocha Barajas, siendo el periodo de ejecución desde el 01/01/2020 hasta el 31/12/2023.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana – Subvenciones programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia- “Patofisiología de las enfermedades cardiometabólicas” con referencia PROMETEO/2019/027, y cuyo Investigador Principal es Dr. Víctor Manuel Víctor González, siendo el periodo de ejecución desde el 01/03/2020 hasta el 30/04/2023.
- Proyecto de concurrencia competitiva financiado por la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana – Subvenciones programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia- “Nuevas perspectivas

en el estudio de la fisiopatología de las enfermedades cardiometabólicas” con referencia CIPROM/2022/32, y cuyos Investigadores Principales son el Dr. Víctor Manuel Víctor González y la Dra. Milagros Rocha Barajas, siendo el periodo de ejecución desde el 01/09/2023 hasta el 31/12/2026.

MENCIÓN INTERNACIONAL

D. Pedro Díaz Pozo desea optar a la mención internacional del título de doctor:

- La tesis doctoral cuenta con un resumen y conclusiones escritas en inglés, uno de los idiomas oficiales de la Universidad de Valencia.
- Durante el periodo de formación el doctorando ha realizado una estancia de seis meses en un centro de investigación fuera de España (Escuela Icahn de medicina en Monte Sinai, Nueva York, EE. UU.).
- La tesis se defenderá en español, excepto la conclusión, que será defendida en inglés.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Víctor y Milagros, por la oportunidad que me brindaron para realizar esta tesis doctoral y por el tiempo que me han dedicado.

A mi madre, Cristina, le agradezco enormemente haberme inculcado la importancia de trabajar en una buena educación con rigor y esfuerzo. A mi padre Juan José, su apoyo incondicional en todas las decisiones que tomo mientras me anima a seguir adelante. A mi hermana Cristina, por ayudarme a consolidar conceptos durante su trabajo final de grado. A Alba por tratar de animarme en cualquier situación y por compartir conmigo momentos buenos y no tan buenos, pero siempre con la mejor de las actitudes. A mis perretas, Isis y Sira, por demostrarme lo que es la lealtad en su máxima expresión. A Alberto, David, José y Rodrigo, mis compañeros de viajes y alegrías.

A Pancho, siempre dispuesto a intentar ver el lado bueno de las cosas y aligerar las situaciones más tensas mediante un uso magistral de memes, tienes mi máximo respeto. A Teresa que, aunque hizo falta que la mitad de laboratorio se fuera de estancia para que no nos quedara más remedio que hablarnos, su alegría y energía han sido de vital importancia. A Zaida, por su increíble capacidad de hacerte tomar las cosas con humor. A Mey, por su sinceridad, amabilidad y toxicidad. Sí, sigo creyendo que deberías protegerte más de los reactivos del laboratorio. A Rosa, pilar maestro del laboratorio, tu organización y tenacidad son dignas de admiración. A Celia, Sandra y Susana por su gran predisposición para orientar en lo que se necesite.

Finally, I would like to thank Professor Adolfo García Ocaña and his group from Icahn School of medicine at Mount Sinai for hosting me for 6 months and allowing me to join his research. It was a very enriching experience.

ESTRUCTURA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABSTRACT	1
1 INTRODUCCIÓN	37
1.1 Diabetes mellitus tipo 2	37
1.1.1 Diagnóstico	37
1.1.2 Epidemiología e impacto socioeconómico	38
1.2 Fisiopatología	38
1.2.1 Homeostasis de la glucosa	38
1.2.2 Ruta de señalización de la insulina	39
1.2.3 Resistencia a la insulina	40
1.2.4 Disfunción de la célula beta pancreática	42
1.3 Expresión clínica de la DM2	42
1.3.1 Hiperglucemia	42
1.3.2 Sobrepeso y obesidad	43
1.3.3 Dislipidemia aterogénica	44
1.3.4 Hipertensión arterial	45
1.4 DM2 y riesgo cardiovascular	46
1.4.1 Inflamación	46
1.4.2 Disfunción endotelial	48
1.4.3 Interacción Leucocito-endotelio	49
1.4.4 Aterosclerosis	50
1.5 Mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología de la DM2	53
1.5.1 Estrés oxidativo	53
1.5.2 Disfunción mitocondrial	58
1.5.3 Autofagia	60
1.6 Tratamiento antidiabético: Metformina	66

1.7	Otras estrategias para el tratamiento de la DM2: nanopartículas de oro-óxido de cerio	67
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	70
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
3.1	Metformina, función mitocondrial y mitofagia	72
3.1.1	Sujetos y muestra	72
3.1.2	Recolección de muestras y determinación de parámetros antropométricos y bioquímicos	72
3.1.3	Aislamiento de PBMCs.....	73
3.1.4	Ensayo de citometría de flujo	73
3.1.5	Ensayo de expresión proteica	73
3.1.6	Microscopía electrónica de transmisión	74
3.1.7	Medición de niveles de citoquinas en suero	74
3.1.8	Análisis estadístico	74
3.2	Nanopartículas Au/CeO ₂ interacciones leucocito endotelio e inflamación.....	75
3.2.1	Sujetos, muestra y parámetros bioquímicos.....	75
3.2.2	Aislamiento de células polimorfonucleares	75
3.2.3	Aislamiento de células endoteliales humanas	76
3.2.4	Caracterización de las nanopartículas.....	76
3.2.5	Evaluación dinámica de las interacciones leucocito-endotelio.....	77
3.2.6	Evaluación estática de las interacciones leucocito endotelio	77
3.2.7	Viabilidad celular y proliferación.....	78
3.2.8	Evaluación de apoptosis celular	78
3.2.9	Medición de producción total de ERO.....	78
3.2.10	Análisis de expresión proteica	79
3.2.11	Análisis estadístico	80
4	RESULTADOS	82

4.1	Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial y la mitofagia en PBMCs de pacientes con DM2.....	82
4.1.1	Parámetros antropométricos y bioquímicos.....	82
4.1.2	Efecto de la DM2 y la metformina sobre la cadena de transporte de electrones y el balance oxidativo en PBMCs	84
4.1.3	Marcadores de mitofagia alterados en pacientes con DM2 y efecto de la metformina	85
4.1.4	Efecto de la metformina en la morfología mitocondrial de PBMCs de pacientes con DM2.....	88
4.1.5	La metformina reduce los niveles de TNF- α e IL-6 en pacientes diabéticos tipo 2	89
4.2	Efecto de las nanopartículas de oro/óxido de cerio sobre la interacción leucocito-endotelio, la inflamación y la autofagia en la DM2.....	91
4.2.1	Parámetros antropométricos y bioquímicos.....	91
4.2.2	Síntesis de las nanopartículas Oro/Óxido de Cerio	92
4.2.3	Interacciones leucocito-endotelio.....	95
4.2.4	Biocompatibilidad de las nanopartículas de Au/CeO ₂	98
4.2.5	Producción de ERO y niveles de NF- κ B.....	99
4.2.6	Autofagia	101
5	DISCUSIÓN.....	103
5.1	Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial y la mitofagia en PBMCs de pacientes con DM2.....	103
5.2	Efecto de las nanopartículas de oro/óxido de cerio sobre la interacción leucocito-endotelio, la inflamación y la autofagia en la DM2.....	106
6	CONCLUSIONES	111
7	BIBLIOGRAFÍA.....	114
8	ANEXO I: PUBLICACIONES	144
9	ANEXO II: PUBLICACIONES	161

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Homeostasis de la glucosa	39
Figura 2. Mecanismos asociados a la resistencia a la insulina.	41
Figura 3. Proceso de formación y patogénesis de la aterosclerosis.....	52
Figura 4. Proceso macroautofágico.....	63
Figura 5. Mecanismo de acción de la metformina.	67
Figura 6. Expresión proteica de los complejos de la ETC y producción mitocondrial de ERO en pacientes diabéticos de tipo 2 y sujetos control.....	85
Figura 7. Niveles de expresión proteica relacionados con la mitofagia y la biogénesis mitocondrial en leucocitos de pacientes diabéticos de tipo 2 y sujetos control	87
Figura 8. Análisis morfológico de mitocondrias de PBMCs de pacientes diabéticos de tipo 2 y de sujetos de control.....	89
Figura 9. Niveles séricos de TNF α , e IL-6 de pacientes diabéticos de tipo 2 y de sujetos de control	90
Figura 10. Imágenes representativas HR-TEM del catalizador Au/CeO ₂	93
Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de campo oscuro del catalizador AuCeO ₂	93
Figura 12. Análisis elemental mediante EDX e imágenes HR-STEM del catalizador AuCeO ₂	94
Figura 13. Espectro XPS del catalizador AuCeO ₂	95
Figura 14 Evaluación de la interacción leucocito-endotelio en presencia y ausencia de Au/CeO ₂ en pacientes con DM2 y sujetos control.....	96
Figura 15. Efectos de las nanopartículas Au/CeO ₂ en la adhesión de leucocitos a la monocapa de HUVECs estimuladas con TNF- α	97
Figura 16. Determinación de la proliferación y viabilidad celular.....	98
Figura 17. Evaluación de la apoptosis en células U937	99
Figura 18. Producción de ERO evaluada mediante DCFH-DA y niveles de NF- κ B.....	100
Figura 19. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la autofagia e imágenes representativas de WB.....	101

Tabla 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los sujetos de control y de los pacientes diabéticos de tipo 2 tratados o no con metformina	82
--	----

Tabla 2. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los sujetos de control y de los pacientes diabéticos de tipo 2 en el estudio con el catalizador AuCeO ₂	91
---	----

ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

AGEs: Productos avanzados de glicosilación

AGL: Ácidos grasos libres

AKT: Proteína quinasa B, también denominada PKB

AMP: Adenosina monofosfato

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

AnnV: Anexina V

ApoB: Apolipoproteína B

ATG: Proteínas relacionadas con la autofagia

ATP: Adenosín trifosfato

Au/CeO₂: Nanopartículas de oro depositadas sobre óxido de cerio

BCECF-AM: 2', 7'-Bis-(2-carboxietil)-5(y-6) carboxifluoresceína, acetoximetil éster

BNIP3: Proteína 3 que interactúa con la proteína BCL-2/adenovirus E1B

BNIP3L: Proteína similar a la proteína 3 que interactúa con la proteína BCL-2/adenovirus E1B

CAM: Moléculas de adhesión celular

CAT: Catalasa

CeO₂: Óxido de Cerio

CoQ: Coenzima Q

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DCFH-DA: 2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DFCP1: Proteína 1 que contiene el dominio FYVE de dedos de zinc

DM2: Diabetes de tipo 2

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ERO: Especies reactivas del oxígeno

ETC: Cadena de transporte de electrones

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido

GABARAP: Proteínas asociadas a receptores de ácido gamma-aminobutírico

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4

GPX: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación

GSK3: Glucógeno sintetasa quinasa 3

H₂O: Agua

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

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

HBSS: Solución salina equilibrada de Hank

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

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

HR-TEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

HUVECs: Células endoteliales humanas de cordón umbilical

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IKK: quinasa de IκB

IL-1β: Interleuquina 1β

IMC: Índice de masa corporal

IMS: Espacio intermembrana mitocondrial

IR: Receptor de insulina

IRS: Sustratos del receptor de insulina

ITQ: Instituto de tecnología química

JNK: Quinasa c-Jun NH₂-terminal

LAMP2B: Proteína de membrana asociada al lisosoma 2 variante B

LC3: Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LIR: Motivos de interacción con LC3

LPS: Lipopolisacárido

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

mTFA: Factor de transcripción mitocondrial A

mTOR: Proteína diana de la rapamicina en mamíferos

NaAuCl₄: Tetracloroaurato de sodio

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAFL: Esteatosis hepática no alcohólica

NAFLD: Ácido graso no alcohólico

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NLR: Receptores tipo NOD

NO: Óxido nítrico

NOX2: NADPH oxidasa 2

NOX4: NADPH oxidasa 4

$\cdot$ OH: Radical hidroxilo

O₂: Oxígeno molecular

O₂⁻: Anión superóxido

OMS: Organización mundial de la salud

ONOO⁻: Anión peroxinitrito

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PCR: Proteína C reactiva

PDE3B: Fosfodiesterasa 3B

PECAM-1: Molécula de adhesión plaqueto-endotelial

PI: Yoduro de propidio

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKB: Proteína quinasa B

PKC: Proteína quinasa C

PKR: Proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena

PMNs: Leucocitos polimorfonucleares

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

RPM: Revoluciones por minuto

RPMI: Medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SOD: Superóxido dismutasa

SQSTM1: Sequestoma 1

STS: Estaurosporina

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TLR: Receptor tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

ULK: Activadora de la Autofagia Tipo Unc-51

VCAM: Molécula de adhesión de célula vascular 1

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

WB: Western blot

WIPs: Proteínas de interacción con fosfoinosítidos de dominio repetido WD

WPB: Cuerpos Weibel-Palade

XPS: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

ABSTRACT

ABSTRACT

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is a complex metabolic disorder caused by defects in glucose metabolism. Sometimes referred to as "non-insulin-dependent diabetes" or "adult-onset diabetes" it accounts for 90-95 % of all diabetic patients. It encompasses individuals with some level of insulin deficiency and those with peripheral insulin resistance. T2D requires continuous monitoring and individualized attention given its high variability among patients depending on lifestyle, age, and the presence of risk factors. In addition, close monitoring is required, especially in newly diagnosed patients, as well as in those with high levels of glycosylated haemoglobin (HbA_{1c}).

T2D is characterized by hyperglycaemia and hyperlipidaemia, which are usually accompanied by hyperinsulinemia in the early stages of the disease. Diagnosis is generally based on the determination of fasting plasma glucose levels; fasting being understood as the absence of caloric intake for at least 8 hours. It also involves the measurement of HbA_{1c} levels, strongly associated with the mean glycaemia of the previous 8-12 weeks. The third and last method recommended by the American Diabetes Association consists of measuring plasma glucose two hours after the administration of 75 g of glucose.

T2D is usually preceded by a prediabetic stage, which is characterized by a certain degree of insulin resistance but lacks severe glucose intolerance and does not meet the diagnostic criteria for T2D. These patients have elevated fasting plasma glucose levels (between 100 and 125 mg/dL), impaired glucose uptake (140 to 199 mg/dL of plasma glucose after glucose overload test) and HbA_{1c} values between 5.7 and 6.4 %. These parameters should also be monitored in individuals with risk factors associated with the development of T2D (first-degree kinship with diabetic individuals, obesity, history of cardiovascular disease, hypertension, HDL values < 35 mg/dL, triglyceride levels > 250 mg/dL, polycystic ovary syndrome, high-risk ethnicities, and individuals with infection).

The global increase in sedentary lifestyles, high-calorie diets and the resulting obesity is leading to a dramatic increase in the number of diagnoses of T2D. The global incidence in 2021 was estimated at 537 million people, with an expected increase to 783 million by 2045. The healthcare costs associated with T2D were estimated at \$966 billion in 2021 and are predicted to rise to \$1,054 billion in 2045. All in all, there is no doubt that T2D is one of the greatest public health threats of our time.

Glucose is one of the body's main sources of energy. It comes mainly from food intake, during which complex molecules are digested, resulting in the release of simple carbohydrates. The processes of glycogenolysis and gluconeogenesis also supply the body with glucose, especially in the absence of food intake. In the human body, there is a complex network of hormones especially insulin and glucagon, and neuropeptides that act together to control blood glucose levels and keep them within a narrow physiological range between 4 and 6 millimol/L (4-6 mM). This process is known as glucose homeostasis and involves organs such as the pancreas, intestine, liver, and brain, as well as muscle and adipose tissues. During sleep or between meals, when glucose levels are low, pancreatic alpha cells release glucagon, which promotes hepatic glycogenolysis. In addition, glucagon also stimulates renal and hepatic gluconeogenesis, all with the aim of maintaining glucose levels within a physiological range. In contrast, pancreatic beta cells release insulin in response to elevated glucose concentrations, e.g. after dietary intake. After binding to their respective receptors in muscle and adipose tissue, insulin-dependent glucose uptake is initiated in the cell by uptake from the bloodstream.

The insulin receptor (IR) is a glycoprotein located in the plasma membrane and is composed of four subunits (heterotetramer). The two alpha subunits are located in the extracellular space and serve as insulin binding sites. The two beta subunits are inserted into the cell membrane and exert tyrosine kinase activity. Upon insulin binding to the alpha subunits, a conformational change occurs that stabilizes the receptor and allows its autophosphorylation at the tyrosine kinase domains of the beta subunits, thereby initiating the insulin signaling cascade. This autophosphorylation serves as a binding site for insulin receptor substrates (IRS). The IRS family comprises 4 members, although the most important for glucose transport are IRS1 and IRS2. Thus, IRS are recruited upon IR activation, become phosphorylated, and serve as anchors for other proteins that continue signaling in a tissue- and cell type-specific manner.

The regulatory mechanisms that make it possible to slow down and modulate insulin signaling are also relevant, as they ensure an uncontrolled response is avoided. In this regard, the role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), whose function is to dephosphorylate the tyrosine residues of the IR or IRS, thus reducing signal transduction, should be emphasized. There are also other mechanisms that phosphorylate certain serine or threonine residues of the IRS, which prevents their activation. However, when these mechanisms are chronically activated (due, among others, to the presence of high levels of free fatty acids or proinflammatory molecules) they can favour the appearance of insulin resistance.

Under normal conditions there is efficient signaling between pancreatic β -cells and insulin-sensitive tissues during which the processes described above are in balance and glucose homeostasis is maintained. However, on certain occasions there is an imbalance in these interactions, affecting the action of insulin on the target tissues, which is referred to as insulin resistance. Thus, cells lose the ability to respond to the hypoglycaemic action of insulin, resulting in a decrease in glucose uptake in peripheral tissues, mainly in adipose tissue. Another consequence of insulin resistance is the activation of lipolysis in adipose tissue, increasing the levels of circulating free fatty acids (FFA). These FFA end up accumulating in skeletal muscle and liver which, in turn, increases insulin resistance.

Under conditions of hyperglycaemia, pancreatic cells expand and proliferate in an attempt to regulate glucose levels by increasing insulin secretion. However, when this situation is chronically maintained over time, hyperglycaemia generates hyperinsulinemia and eventually glucotoxicity. The special sensitivity of the beta cell to these stress conditions, coupled with the gradual depletion by increased insulin demand, results in the inability of the beta cell to secrete sufficient insulin to maintain glucose levels within the physiological range. At this point, the excessive metabolic load, and the stressful conditions in which it finds itself, triggers detrimental processes in the beta cell and, ultimately, apoptosis. Therefore, it is known that beta cell dysfunction plays a major role in the development and pathophysiology of T2D. It has been observed that the pancreas of patients with T2D presents a 40 % reduction in the total number of beta cells. However, it has been shown that after reduction of blood glucose levels by various treatments (bariatric surgery or glucose-lowering therapies) fasting insulin secretion and total insulin secretion in response to glucose are lower, thus increasing beta-cell sensitivity. This demonstrates that beta cell deficit and dysfunction is unlikely to be the sole cause of T2D and that live pancreatic beta cells can be recovered in T2D, though desensitized to a greater or lesser extent. With all this in mind and considering the indisputable role of beta-cell dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of T2D, the question of which of these is critical for the development of the disease and which appears first are subjects of great controversy. In any case, the process of the onset and development of T2D is multifactorial and influenced by the aforementioned processes, as well as by other genetic and environmental components.

The treatment and management of T2D is complicated by numerous pathophysiological alterations. Insofar as the prevention of microvascular complications, the main objective is adequate glycaemic control. The goal is to reduce HbA_{1c} levels to normal values without causing adverse effects, of which hypoglycaemia is the most dangerous. On a practical level, the goal is

to reduce HbA_{1c} levels to below 6.5 %, a level at which patients with T2D are not more likely to develop diabetic retinopathy or other comorbidities.

It should be noted that most patients with T2D are obese or overweight at the time of diagnosis. Physical inactivity, together with excessive caloric intake and a certain genetic predisposition, are the main factors related to the development of diabetes and obesity. Obesity is a disease characterized by an excessive accumulation of fat that leads to metabolic imbalances, especially insulin resistance, the meeting point between obesity and T2D. In this regard, it should be noted that adipose tissue is a metabolically active organ with a very important role in energy homeostasis. In obese patients, the hyperplastic capacity of the adipocyte is altered, producing hypertrophic expansion and remodeling of the adipose tissue, causing an increase in the size of the adipocytes with the consequent loss of function.

When these conditions are present, the hypertrophied adipocyte will exhibit high levels of lipolysis and mobilization of FFA to other metabolic depots and organs. Of particular importance are the liver and muscle tissue, where FFA, once activated after binding to coenzyme A, can be oxidized in the mitochondria or stored. However, when the storage and oxidation capacity is exceeded, FFA and their derivatives accumulate, triggering a series of signals and responses that interfere with the insulin pathway. For example, at the muscular level there is a blockage of glucose transport in response to insulin as a consequence of increased plasma FFA levels. Similarly, these high FFA levels can adversely affect insulin action through phosphorylation of IRS-1 by certain serine/threonine kinases.

Atherogenic dyslipidaemia is defined as a series of alterations in blood levels of lipids and lipoproteins with potential atherogenic capacity. They are usually classified according to their origin, with primary dyslipidaemia being that of genetic origin and secondary dyslipidaemia that associated with other diseases. As mentioned above, lipid metabolism is altered due to insulin resistance in T2D. Thus, in diabetic dyslipidaemia we find hypertriglyceridemia accompanied by a reduction in the levels of high density lipoproteins (HDL) and an increase in the levels of low density and very low density lipoproteins (LDL and VDL respectively), apolipoprotein B (ApoB) and FFA.

Atherogenic dyslipidaemia is considered one of the most significant cardiovascular risk factors in the diabetic population. In fact, it has been observed that, at equivalent LDL cholesterol levels (even within the recommended limits), T2D patients with a higher proportion of small, compact LDL particles are exposed to a higher cardiovascular risk. Triglycerides themselves do not contribute to atheroma plaque formation, but triglyceride-rich lipoproteins

have been shown to play a causal role in the development of coronary artery disease. HDL cholesterol is responsible for the reverse transport of cholesterol from the tissues to the liver, facilitating the elimination of cholesterol from the arterial walls, and it is for this reason that there is an inverse correlation with cardiovascular risk. For all these reasons, in addition to lifestyle changes such as changes in diet, abandonment of bad habits and increased physical activity, treatment with lipid-lowering agents such as statins or fenofibrate is usually required in the T2D population.

It is well known that patients with T2D have an increased risk of developing cardiovascular complications; specifically, it has been observed that around 32 % of the diabetic population has some type of cardiovascular condition. Most of these conditions have an inflammatory origin involving vascular endothelial dysfunction and the atherosclerotic process. In fact, the prevalence of atherosclerosis in T2D is 29.1 %.

One of the most important characteristics of T2D as a chronic disease is the existence of a general low-grade inflammatory state. Some authors have come to define T2D as an inflammatory disease because of the close relationship between the two. This is reflected in the high levels of inflammatory markers and proinflammatory molecules present in the diabetic population. On the other hand, the existence of elevated levels of C-reactive protein (CRP), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) are considered predictive markers for the development of T2D.

In T2D, two of the main producers of circulating proinflammatory cytokine levels are the liver and adipose tissue, mainly due to their size and high metabolic capacity. One of the main proinflammatory cytokines is tumor necrosis factor- α (TNF- α), which is released mainly by macrophages recruited in adipose tissue, generally in a context of excessive expansion and hypertrophy maintained over time. TNF- α , together with other cytokines and excess saturated fatty acids, will activate protein kinase C (PKC), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and I κ B kinase (IKK) signaling pathways, thus leading to NF- κ B activation. Activation of these pathways ultimately leads to phosphorylation of IRS at their serine (rather than tyrosine) residues, which decreases their affinity for IR, thereby impairing signal transduction of the insulin pathway and contributing to insulin resistance.

Hypoxia is another of the inflammatory mechanisms associated with T2D and occurs mainly in hypertrophied adipose tissue. When this tissue grows above its natural capacity, hypoxic regions are generated where macrophages accumulate, which in turn leads to the

release of proinflammatory and proangiogenic molecules that contribute to the overall inflammatory state.

Regarding endothelial dysfunction, under conditions of homeostasis, endothelial cells maintain blood flow and its fluidity, control vascular permeability, and regulate the activation of leukocytes. A resting endothelium does not interact with immune cells due to the lack of expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and because Weibel-Palade bodies (WPB) remain stored. In parallel, the endothelium regulates tissue flow and perfusion through modifications in vascular tone and diameter. This is achieved through the production and secretion of molecules with vasodilatory (such as prostacyclin and nitric oxide (NO)) and vasoconstrictive (such as angiotensin II and endothelin 1) capacity. In this sense, NO-mediated transcriptional repression of NF- κ B seems to be responsible for the maintenance of the resting state, which inhibits the expression of chemokines, proinflammatory cytokines, and leukocyte adhesion molecules.

Under hyperglycaemia, insulin resistance and inflammation conditions, there is an imbalance in the release of vasodilator and vasoconstrictor factors that alters the activity of the endothelium and produces a decrease in the release of endothelial NO, a situation known as endothelial dysfunction. When the endothelium is in this state, there is a greater predisposition to favour inflammation, platelet activation, leukocyte infiltration, oxidative stress, vasoconstriction, altered coagulation and, ultimately, atherosclerosis and thrombosis. Thus, hyperglycaemia is considered one of the main factors in the development of endothelial dysfunction in patients with T2D, since it generates vascular damage by triggering an imbalance in the bioavailability of NO in favour of the accumulation of reactive oxygen species (ROS). This is due to the reaction of NO with superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) to form peroxynitrite anion ($ONOO^-$), which increases oxidative stress while reducing NO bioavailability. Furthermore, insulin regulates NO production through the PI3K-dependent signaling pathway. In a context of insulin resistance in which this pathway is altered, available NO levels are compromised, thus contributing to the appearance of endothelial dysfunction.

The role played by leukocytes in T2D is especially relevant. Not only are they related to a great variety of the complex molecular processes associated with the pathophysiology of T2D, but their activation and altered function have been linked to the pathogenesis of the disease. Leukocytes are cells with high glucose permeability and enhanced glucose metabolism also acting as sensors of the body's redox state. Therefore, in a context of hyperglycaemia maintained over time, a series of pathological processes will be triggered, such as high ROS

production, excessive production of proinflammatory cytokines and increased interactions with the endothelium, among others. Likewise, an inadequate activation of the immune system has also been related to the appearance of insulin resistance. It has been proposed that IKK β is an underlying mechanism of these processes, as its increased expression in leukocytes favours the activation of the inflammatory cascade and as previously mentioned, promotes insulin resistance through the phosphorylation of IRS at its serine residues.

Altered leukocyte-endothelium interactions are another of the consequences of the low-grade inflammatory state observed in T2D. The presence of inflammatory stimuli produces the release of chemokines and cytokines by endothelial cells, which favour the movement of leukocytes towards the vascular wall. In parallel, these proinflammatory molecules stimulate the production of adhesion molecules on the endothelial surface, allowing them to bind to circulating leukocytes. At this point, the proteins that mediate the initial contact between leukocytes and endothelium are selectins; specifically, E-selectin (present in active endothelial cells) and L-selectin (constitutively expressed in leukocytes). After this first contact, the junction between the leukocyte and the endothelium is not firm enough to hold them together. Therefore, the leukocyte "rolls" along the endothelium in a process mediated by P-selectin (expressed on the endothelial surface). Thus, the leukocytes slow down as they interact with the endothelium until they adhere firmly to it due to the binding of integrins (leukocyte surface) with immunoglobulin receptors located on the endothelial surface (ICAM and VCAM). Finally, these, together with other proteins, such as platelet-endothelial adhesion molecule (PECAM-1), mediate the process of leukocyte diapedesis or extravasation through the intercellular spaces in the endothelium.

One of the most common cardiovascular complications in T2D is the development of atherosclerotic lesions. These occur in a proinflammatory environment which, as mentioned above, is usually accompanied by hyperlipidaemia and endothelial dysfunction. Atherosclerosis consists of the formation of atheromatous plaques in the vasculature, largely generated by the encapsulation of lipids, cholesterol, calcium, and apoptotic cells in the vascular tunica media. The process begins with the accumulation of LDL in the subendothelial space, where they are oxidized by ROS or by enzymes such as lipooxygenases and myeloperoxidases released by cells of the immune system. It should be noted that patients with T2D suffer considerable changes in LDL particles, with the appearance of denser and smaller LDL molecules that are more easily able to cross the endothelial wall and be oxidized, thus favouring the atherosclerotic process. In this way, oxidized LDL promotes the activation of endothelial cells, increasing their permeability and favouring the release of cytokines, chemokines and proinflammatory molecules. At this

point the recruitment of immune cells occurs, with monocytes being the first to arrive at the site of activation and migrate to the subendothelial space where, through their scavenger receptors, they recognize the oxidized LDL. This recognition results in the differentiation of the monocyte into a macrophage, after which the oxidized LDL particles are endocytosed and accumulate in the cytoplasm, transforming the macrophages into foam cells. The existence of high concentrations of LDL in the subendothelial space can overwhelm the accumulation capacity of macrophages, promoting apoptosis of foam cells that eventually release their entire contents into the vascular wall. This process increases the immune response, attracting more leukocytes to the site and setting the stage for the formation of the atheroma plaque.

As the atherosclerotic lesion progresses, the proinflammatory state is enhanced and smooth muscle cell proliferation is favoured. In this final stage, growth factors secreted by endothelial cells and smooth muscle cells, such as fibroblast growth factor, are released, leading to the formation of a fibrous cap formed by proteoglycans and collagen, among others, which widens the lesion. Thus, the atheroma plaque can lead to occlusion of the vessel where it is located or, in case of rupture, to occlusion of distant vessels through thrombus formation.

Oxidative stress is the consequence of an alteration of the balance between the production of molecules with oxidative potential and the availability of compounds designed to counteract their effect (antioxidant defences). When this happens, the redox state of the cell is altered, triggering numerous pathological processes associated with metabolic diseases such as T2D.

Free radicals appear in various forms, depending on the nature of the reactive atom in question. Different types of reactive species can be found, such as nitrogen or sulphur species, although, undoubtedly, the most important are ROS. ROS production can result from the oxidation of water molecules (H_2O) or the reduction of molecular oxygen (O_2), resulting in hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) and superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$). The mitochondrion is one of the main sites of ROS production. It is a double membrane organelle whose main function is energy production. The mitochondrial matrix is the site of the Krebs cycle, fatty acid beta-oxidation and ATP synthesis by oxidative phosphorylation. The latter is the process by which electrons, transferred by nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide ($FADH_2$), are transported through five protein complexes - together called the electron transport chain or ETC - for ATP synthesis. This synthesis is dependent on the proper functioning of the ETC and the maintenance of an electrochemical proton gradient that serves as a driving force.

Some of the electrons yielded to the ETC do not complete the path to complex IV and instead are directly transferred to O_2 generating $O_2^{\cdot-}$. Thus, up to 2 % of molecular oxygen is consumed by cells without generating ATP. The $O_2^{\cdot-}$ is generated mainly in complexes I and III and is rapidly converted to H_2O_2 by SOD. When the ETC is impaired, the amount of ROS produced is greatly increased. Under conditions of hyperglycaemia, glucose overload causes cellular metabolism to increase in an attempt to cope with the elevated nutrient availability. When the ATP/ADP ratio is very high due to the lack of energy demand that often occurs in diseases such as T2D or obesity, ATP production in complex V is arrested. Consequently, a high proton gradient is observed in the mitochondria, as well as large amounts of reduced coenzyme Q that favour the reverse transport of electrons. Therefore, these electrons will not have oxygen as a final acceptor, but will remain in the transporters or the mitochondrial complexes and can react and damage various molecules, as well as generating ROS. It should also be mentioned that ETC is not the only source of ROS in the mitochondria, since they can also be produced by enzymes that participate in various metabolic processes, such as alpha-ketoglutarate dehydrogenase in the Krebs cycle.

Compounds with antioxidant activity are those that eliminate or prevent the excessive formation of free radicals, maintaining their levels in the physiological range. Given the important role they play in the cell, it is necessary that they can act in hydrophilic and hydrophobic cellular compartments, so their molecular structure is diverse.

There are several enzymes that prevent the accumulation of free radicals by acting directly on ROS (primary enzymes) and enzymes that have an indirect role by assisting other antioxidants (secondary enzymes). The substrates of primary enzymes are the products of incomplete oxygen reductions, mainly $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , while secondary enzymes are responsible for replenishing the necessary components such as NADPH and glutathione (GSH).

Oxidative stress plays a fundamental role in the development of T2D, as well as in its pathogenesis and associated complications, and is considered one of the underlying factors of these processes. It has been demonstrated that patients with T2D produce a greater amount of ROS than healthy subjects, in addition to showing high levels of tissue damage related to oxidative stress and lower antioxidant defences. The main factor responsible for oxidative stress in patients with T2D is hyperglycaemia. Increased glucose levels increase ROS production in the ETC, which in turn compromises glucose metabolism through glycolysis and the Krebs cycle, accumulating intermediates such as glyceraldehyde 3-phosphate. At this point, advanced glycosylation products (AGEs) are formed and pathways that metabolize these intermediates,

such as the polyol pathway or the hexosamine pathway, are set in motion. As a result, ROS production and oxidative stress are exacerbated.

Pancreatic beta cells are particularly sensitive to ROS accumulation due to their low production of antioxidant defences. Mitochondrial ROS can damage mitochondrial DNA and impact on respiratory efficiency. This results in an increased reliance on glycolysis for ATP production, which is much less efficient than oxidative phosphorylation. Consequently, there is a reduction in the available amount of ATP, which impairs the function of ATP-dependent ion channels necessary for insulin release. Another mechanism by which mitochondrial ROS affect beta-cell function is through irreversible downregulation of the transcription factors PDX-1 and MAF-A, both vital for insulin secretion and beta-cell identity. In addition, the presence of high concentrations of ROS also activates IKK, which ameliorates insulin pathway signaling by phosphorylation of IRS at its serine residues. Finally, ROS can induce activation of the JNK-mediated apoptotic pathway, thus causing beta-cell mass decrease.

Mitochondrial dysfunction is defined as the state in which mitochondria are unable to meet cellular ATP requirements. Mitochondrial dysfunction is usually accompanied by an alteration in the number, density, or structure of mitochondria, which affects the ETC. There are genetic factors that can lead to a state of mitochondrial dysfunction, such as alterations in genes encoding proteins related to oxidative phosphorylation or in genes encoding mitochondrial structural proteins. On the other hand, there are also environmental factors that produce oxidative stress and eventually damage the mitochondria.

Mitochondria are the main producers of ROS in the cell, so they are also the organelles most affected by oxidative damage. Mitochondrial DNA is particularly sensitive to ROS damage because, unlike nuclear DNA, it is not associated with histones. Mitochondrial DNA encodes several proteins necessary for the oxidative phosphorylation process, so its alteration implies an incorrect functioning of the ETC. This, in turn, generates increased production and release of ROS, initiating a cascade of processes that can lead to the induction of apoptosis. Similarly, ROS generated in the oxidative phosphorylation process damage mitochondrial proteins, affecting their affinity for substrates and coenzymes. These events are particularly important for complex I of the ETC, as it is one of the main sites of ROS generation in the mitochondrion and, therefore, one of the most susceptible to oxidative damage. Moreover, in relative terms, the mitochondrial inner membrane has a lower amount of complex I than the rest of the complexes of the ETC, so its alteration or deterioration is especially relevant for mitochondrial function. Elevated levels of ROS can also damage some mitochondrial membrane phospholipids, such as cardiolipin.

Altered cardiolipin allows the passage of protons from the intermembrane space into the mitochondrial matrix, thus producing a partial loss of membrane potential.

Mitochondrial dysfunction is detected by the presence of abnormal levels of oxygen consumption, as well as changes in membrane potential. Excessive ROS production, low ATP production and proton leakage from the inner membrane to the matrix are also observed, forcing the cell to rely on glycolysis for ATP generation instead of oxidative phosphorylation. Under these circumstances, mitochondria may alter their shape, increasing or decreasing in size to meet cellular demands for energy and metabolites. In this way, mitochondria can be redistributed by fusion and fission events, eliminated by a specific form of autophagy called mitophagy, and replenished by the generation of new mitochondria (mitochondrial biogenesis).

Autophagy is a highly evolutionarily conserved catabolic process common to all eukaryotic species. It is one of the main regulatory mechanisms of body homeostasis and is involved in basic metabolic processes and in more complex processes such as aging, cancer, T2D and other metabolic disorders. During the autophagic process, proteins and peptides are broken down, helping the cell to adapt to different stress situations by providing a reserve of amino acids. In addition, autophagy regulates intracellular conditions at its most fundamental level through cytoplasmic turnover of proteins and organelles. Recently, the concept of selective autophagy has been defined and it has been shown that the autophagic machinery is able to detect specific substrates, such as mitochondria, lipid droplets and peroxisomes, leading to their breakdown and recycling. Autophagy has also been shown to play an important role in innate and adaptive immunity, for example, by facilitating the binding of endogenous antigens to major histocompatibility complex-II (MHC-II) molecules.

There are three main types of autophagy: macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy. Macroautophagy (hereafter autophagy) consists of the confinement of cytoplasmic contents in a double membrane called an autophagosome, followed by fusion with a lysosome where the contents will be digested by lysosomal enzymes. Microautophagy consists in the direct absorption of the cytoplasmic cargo into the lysosome, without the formation of an autophagosome. Finally, in chaperone-mediated autophagy, proteins are selectively guided to lysosomes by certain peptides and assisted by chaperones in their binding to lysosomes.

The autophagic process is mediated by multiple autophagy-related proteins (ATGs) and can be divided into at least five sequential steps: (1) initiation, (2) nucleation of the double membrane and formation of a pre-autophagosome or phagophore, (3) elongation of the

phagophore and sequestration of the cytoplasmic cargo, (4) fusion of the autophagosome (the fully enclosed phagophore) with the lysosome, and (5) degradation of the sequestered cargo in the autolysosome.

Autophagy is controlled by both "immunospecific" signals and more general signals in response to the nutritional environment. In this regard, there are multiple immune signals that regulate autophagy; for example, autophagy is triggered by several families of pathogen recognition receptors such as TLRs, NOD-like receptors and double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), damage-associated molecular patterns (DAMPs, such as ATP, ROS, and misfolded proteins), JNK, TNF- α and IKK β . On the other hand, it is also inhibited by NF- κ B and cytokines produced by type 2 T-helper T lymphocytes. As we have discussed in previous sections, all the aforementioned pathways are related to diabetes and its complications.

As previously stated, high glucose concentrations cause oxidative stress and damage various cellular structures if they persist over time. Thus, the accumulation of defective organelles within the cell, such as mitochondria, is an expected result of impaired autophagy. As discussed above, mitochondria are the main site of ROS production, and an imbalance in the cytoprotective and recycling function of autophagy can lead to excessive ROS accumulation.

Studies on the role of autophagy in leukocytes from patients with T2D are contradictory. Some studies indicate that autophagy is inhibited in this cell line, leading to increased markers of inflammation. Other studies suggest that autophagy induced by oxidative stress and nitrosative stress acts as a rescue mechanism in leukocytes from T2D patients with dyslipidemia, or that blocking autophagy in palmitate-activated leukocytes causes death by apoptosis. Therefore, the results regarding autophagy in leukocytes from patients with T2D are quite disparate and vary depending on the cellular and metabolic context.

The autophagic process can also mediate the degradation of material in a specific manner. This type of autophagy, called selective autophagy, is based on the use of certain receptors that recognize specific motifs or sequences of molecules or organelles and mark them for degradation.

There are different types of selective autophagy depending on the cargo to be degraded. Thus, we can distinguish between peroxiphagy, which refers to the autophagic degradation of peroxisomes, reticulophagy, which mediates the selective degradation of the endoplasmic reticulum, and lipidophagy, which is responsible for the degradation of lipid droplets, among others. Special mention should be made of mitophagy, a process of autophagic labeling and degradation of mitochondria, due to the importance of mitochondria in metabolic pathologies.

One of the main routes of initiation of mitophagy is mediated by PINK1 kinase and Parkin ubiquitin ligase. In healthy mitochondria, PINK1 is processed and released into the mitochondrial matrix; however, upon loss of membrane potential, PINK1 accumulates in the mitochondrial outer membrane, thus recruiting Parkin. The polyubiquitination triggered by Parkin allows the anchoring of specific autophagy receptors such as p62 or the LC3 family of proteins that mediate the formation of the autophagosome and the degradation of its contents. Other mechanisms of mitophagy initiation in response to mitochondrial damage are mediated by MIEAP, BNIP3 and BNIP3L (NIX) proteins, which regulate the repair or degradation of damaged mitochondria.

In terms of T2D treatments, metformin is the most prescribed drug worldwide for the treatment of T2D. Although the mechanisms of action of metformin are still under study, numerous beneficial effects have been described: decreased glucose levels and increased insulin sensitivity, improvements in inflammation markers and lipid profile, as well as a reduction in body weight. The reduction in circulating glucose levels is known to be caused by inhibition of hepatic gluconeogenesis due to increased insulin sensitivity.

Metformin enters the liver cells via the organic cation transporter (OCT) and can diffuse into the mitochondria where it will inhibit complex I of the ETC, possibly stabilizing it in a low-activity conformation. As a result, electron flow is reduced, with a consequent decrease in ATP levels; therefore, AMP/ATP and ADP/ATP ratios increase, activating AMPK kinase. This enzyme is a metabolic regulator whose activation, among other effects, promotes insulin action. On the other hand, the increase in AMP levels causes a decrease in the synthesis of cyclic AMP (cAMP) in response to glucagon, which indicates a reduction, at least partial, in the signaling pathway of this hormone and a consequential drop in circulating glucose levels. Another mechanism involved in the lowering of glucose levels is the inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase (FBP). Stabilization of ETC complex I also leads to a reduction in ROS production, thus alleviating oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

Regarding the effects of metformin on cardiovascular health, it has been shown to have positive effects in type 2 diabetic patients. However, these beneficial effects on the heart and vasculature are not only due to improvements in glycaemic control but are also the result of multiple interactions with the cardiovascular system. Thus, although the exact mechanisms are not known, antiatherogenic, anti-inflammatory and endothelial function-enhancing properties have been observed.

Regarding the study of alternative strategies for the treatment of T2D, one of the most promising fields is that of nanoparticles. The use of nanoparticles in biomedicine is a very active

area of research that could provide new therapeutic systems for the treatment of diabetes, cancer and other diseases involving oxidative stress and/or mitochondrial dysfunction. The main reasons for using nanoparticles as therapeutic agents are: (i) they can penetrate biological membranes, (ii) an active agent can be included in their formulation and (iii) they can be directed to a specific target tissue using molecules anchored to the nanoparticle structure.

There are numerous studies where many metallic and polymeric nanoparticles have been explored, while less attention has been paid to metal oxide particles, probably due to a greater difficulty in the process of obtaining this type of nanoparticles with the right size. Among the different types of nanoparticles, those containing cerium oxide (CeO₂) are particularly promising due to their versatility and physicochemical properties. In this context, studies have described the biocompatibility of cerium oxide nanoparticles, as well as their ability to decompose ROS generated under oxidative stress in the cell. Thus, they have been studied *in vivo* and *in vitro* as "quenchers" or ROS scavengers in different cell types; for example, it has been demonstrated that they are able to rescue HT22 cells (mouse neuron cell line) from death caused by oxidative stress. They have also been shown to be protective against radiation in mammary cells, to be cardioprotective and to reduce endothelial inflammation due to their catalytic activity, which mimics superoxide dismutase activity.

This antioxidant capacity can be enhanced when nanoparticles are combined with certain metals, such as silver, platinum, or gold. These combinations have been shown to have biocompatible properties and can also act as scavengers of ROS and catalase-like activities, thus modulating oxidative stress conditions. Regarding biomedical applications of nanoparticles, those containing gold in their formulation are among the most promising. Gold nanoparticles have demonstrated beneficial effects in animal models of diabetes by decreasing the levels of liver enzymes, TNF- α and interleukin-6, or by restoring normal levels of blood glucose, glycogen, and insulin. In addition, gold nanoparticles can be conjugated with metformin, a standard treatment for T2D, having demonstrated their beneficial actions by inhibiting the production of advanced glycation end products (AGEs), as well as reducing early glycation products and carbonyl group content, among others.

As discussed above, although the etiology of insulin resistance and T2D is intricate, different studies have pointed out that ROS can induce oxidative stress and exacerbate insulin resistance, highlighting the therapeutic potential of antioxidants. In this regard, there is abundant *in vitro* and *in vivo* evidence to support the potential of gold nanoparticles as antioxidants in T2D models, among others.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Having established that T2D is associated with mitochondrial dysfunction, we hypothesised that pharmacological approaches such as metformin (the first line of treatment for this pathology) and the use of nanoparticles with antioxidant capacity could protect and rescue the leukocytes of patients with T2D from mitochondrial dysfunction and the molecular alterations they present.

For all these reasons, we set ourselves the following objectives:

1. To evaluate the effect of metformin on mitochondrial function in PBMCs from patients with T2D. To analyze the status of ETC components and mitochondrial ROS levels. To study the activation status of mitophagy in PBMCs from type 2 diabetic patients, as well as the effect of metformin treatment.
2. To analyze mitochondrial morphology in PBMCs from type 2 diabetic individuals, as well as serum proinflammatory cytokine levels. To assess the effects of metformin on both.
3. To physiochemically characterize cerium oxide-gold nanoparticles and establish an optimal gold amount to modulate altered leukocyte-endothelium interactions in T2D.
4. To study the biocompatibility of cerium gold-oxide nanoparticles, as well as their effect on ROS production, inflammation, and autophagy, in a context of leukocyte-endothelium interaction in T2D.

MATERIALS AND METHODS

1. Metformin, mitochondrial function and mitophagy

Subjects and sample

For this study, 101 healthy subjects and 141 type 2 diabetics were recruited from the endocrinology and nutrition service of the Doctor Peset University Hospital, Valencia (Spain). At the time of recruitment, 93 of the 141 type 2 diabetic patients had received daily treatment with 1700 mg of metformin for at least one year. The study was approved by the centre's ethics committee, complying with the principles of the Helsinki declaration and all patients having signed their respective informed consent form. For inclusion in the T2D group, the diagnostic criteria of the American Diabetes Association were followed. Exclusion criteria for the study were: BMI greater than 35; history of cardiovascular disease; presence of autoimmune, infectious, hematological or cancer diseases. Control subjects were recruited through advertising campaigns in social networks and other media following the inclusion criteria of being over 35 years of age, living in Valencia, Spain and without a diagnosis of T2D.

Sample collection and determination of anthropometric and biochemical parameters

All patients recruited for the study attended the endocrinology department of the Hospital Doctor Peset after at least 12 h of fasting and not having taken any anti-inflammatory drug in the previous 24 h. Anthropometric values (weight, height, blood pressure, waist diameter and pelvis diameter) were obtained in the nursing department and 30 mL of peripheral blood was drawn. BMI was calculated with the formula: $\text{weight (kg)} / (\text{height(m)})^2$. The biochemical parameters determined were: immunological assay for the determination of insulin levels (Architect Insulin Reagent Kit, Chicago, IL, USA); measurement of glucose levels by the automatic enzymatic method with the Beckman Synchron LX20 device (Beckman Coulter, Brea, CA, USA); measurement of glycosylated hemoglobin levels with the automatic analyzer (Arkray Inc., Kyoto, Japan); and other enzymatic assays for measurement of total cholesterol, HDL and triglyceride levels. Subsequently, the homeostatic model of insulin resistance level (HOMA-IR) was calculated using the formula: $\text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glucose (mg/dL)} / 405$. LDL levels were calculated using the Friedewald formula.

Isolation of PBMCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 8 mL of EDTA-anticoagulated peripheral blood using an immunomagnetic method (MACSprep Leukocyte Isolation Kit, human kit, Cat. Number 130-115-169, Milteny Biotech, Germany), following the manufacturer's protocol. Possible erythrocyte contamination was removed using red cell lysis solution (Milteny Biotech). The resulting leukocyte dilution was resuspended in HBSS buffer and aliquoted as necessary for subsequent experiments.

Flow cytometry assay

200 μL of the previously isolated leukocytes were labeled with 5 μL of APC-CD45 antibody (BD pharmingen APC-mouse anti human CD45. CAT number 555485 BD biosciences, NJ, USA) and incubated for 15 min. Next, 1 μM of MitoSox (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA) was added and incubated for 10 minutes. Fluorescence was measured on a C6 Accuri cytometer (BD Biosciences, NJ, USA) with a blue laser (488 nm) and a FL3 filter (585/40 nm) (mitoSOX Ex/Em = 510/580). Cells (10,000) were analyzed in each experiment, and the fluorescence recorded was relativized to that of an internal control consisting of U937 cells that had been subjected to the same protocol.

Protein expression assay

Protein was extracted from the previously isolated leukocytes and frozen at -80 °C, following a RIPA buffer protocol. Pellets were resuspended in 50-80 µL of RIPA buffer, incubated for 15 min on ice, and centrifuged for 15 min at 13,000 rpm, at 4 °C. The supernatants were collected, and the proteins were quantified following the BCA protein quantification assay (Pierce-Thermo Scientific, MA, USA). Next, 25 µg of the obtained proteins were separated and transferred to a nitrocellulose membrane (Biorad, CA, USA), as previously described. The membranes were blocked and the proteins were detected using specific antibodies diluted in blocking buffer against PINK1 (Sigma-Aldrich, Ref. sab1411281, dilution 1/1000), Parkin (Abcam, Ref. ab77924, 1/500), NBR1 (Abcam Ref. 16004-1-AP, 1/1000), BNIP3L/NIX (Sigma-Aldrich, Ref. N0399, 1/1000), mTFA (Santa Cruz, Spain, Ref. sc-376672, 1/1000), PGC1α (Abcam, Ref. ab54481, 1/1000), AMPK (Abcam, Ref. ab80039, 1/1000), P-AMPK (Abcam, Ref. ab133448 1/1000), VDAC (Abcam, Ref. ab14734, 1/1000) and OXPHOS human antibody cocktail (Abcam, Ref. ab110411, 1/1000, which detects NDUFB8, SDHB, UQCRC2, COXII and ATP5A subunits of the I-V complexes, respectively). Specific secondary antibodies (goat anti-rabbit antibody (Ref. PI-1000) from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) and goat anti-mouse antibody (Ref. 31420, Thermo-Fisher) were incubated for 60 min. Protein signal was obtained using SuperSignal West Pico Plus (Ref. 34580) or Femto (Ref. 34095) chemiluminescent reagent (both from Thermo-Fisher Scientific) and the Fusion FX5 imaging system (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, France). Densitometric quantification was performed with Bio1D software (Vilber Lourmat). The signal of each protein was relativized with respect to an internal control consisting of a set of proteins from U937 cells used to compare the results of the different experiments. In addition, some of the membranes were cut with the molecular weight marker guide to analyze different proteins in the same experiment.

Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), an aliquot of whole blood (1 mL) was diluted in Karnovsky's solution (1:4) and incubated for 30 min, and leukocytes were then separated using the abovementioned protocol. The leukocytes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. The pellet was washed once with PBS and, after centrifugation, carefully resuspended in 500 µL of Karnovsky's solution and incubated for 1 h at room temperature. The sample was then stored at 4 °C until processing for TEM. TEM staining, embedding and ultrathin sections were performed by the Microscopy Service of the University of Valencia. Observation and image recording were performed with the JEM -1010 microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at a magnification of 7000x and a voltage of 100 kV. The different mitochondrial shape parameters were measured with ImageJ.

Measurement of cytokine levels in serum

Serum levels of TNF- α and IL-6 were measured with a Luminex[®] 200 assay system (Austin, TX, USA) following the manufacturer's procedure for the Milliplex[®] MAP Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Intraserial and interserial coefficients of variation were < 5.0 % and < 20.0 %, respectively.

Statistical analysis

The normal distribution of the samples was confirmed with the Kolmogorov-Smirnov test or the Saphiro-Wilk test, depending on the sample size. Normally and non-normally distributed data were expressed as mean $\pm$ SD and median $\pm$ (25th-75th percentiles), respectively. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was used to compare the 3 groups. The possible influence of age and BMI was corrected with ANCOVA (multivariate general linear model). Differences were considered significant when $p < 0.05$, with a 95 % confidence interval. The analysis was performed with SPSS 25.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA), and GraphPad (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used to represent the data with bar graphs, representing the mean and standard error of the mean (SEM).

2. Au/CeO nanoparticles₂ leukocyte-endothelium and inflammation interactions

Subjects, sample, and biochemical parameters

For this second part of the doctoral study, a cohort of 57 patients with T2D were recruited from the Endocrinology Service of the Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia, Spain) after being diagnosed once again according to the criteria of the American Diabetes Association. Fifty-one healthy controls were also recruited as described previously in the first part of the thesis.

Inclusion criteria were age between 40 and 70 years and an evolution of diabetes of more than 10 years. Exclusion criteria were significant renal insufficiency (creatinine > 1.5 mg/dL or eGFR < 60 mL/min/1.73 m²), a smoking habit, frequent alcohol intake, severe diabetic neuropathy, morbid obesity (BMI > 40 kg/m²), and the presence of chronic diseases other than those directly related to cardiovascular risk. All subjects were informed of the procedures and parameters evaluated and gave their written informed consent. The study was approved by the Hospital Ethics Committee and was performed in accordance with the Declaration of Ethical Principles for Medical Research of the Declaration of Helsinki. The anthropometric and biochemical parameters studied were obtained as described previously.

Polymorphonuclear cell isolation

Polymorphonuclear (PMN) cells were obtained from heparinized blood samples. First, whole blood samples were incubated for 45 min with a 1:2 volume of dextran (3 %) in NaCl (0.9 %; Sigma Aldrich, MO, USA) solution, and the supernatant was centrifuged over Fycoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for 25 min at 650 g. The resulting pellet was incubated with lysis buffer to remove remaining erythrocytes (5 min at RT) and centrifuged at 250 g. Finally, pellets containing PMNs were washed twice and resuspended with Hank's balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich, MO, USA) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium (Sigma Aldrich, MO, USA), depending on their experimental use. In addition, LUNA-FL (Logos Biosystems Inc., Annandale, VA USA) was used to determine cell count and viability (double staining with acridine orange and propidium iodide). A human macrophage-type cell line (U937) was used for proliferation and viability studies.

Isolation of human endothelial cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from umbilical cords by treatment with type II collagenase. Pass 1 of the primary culture was used in subsequent experiments. For adhesion studies, HUVECs were cultured on 25 mm plastic plaques until they reached confluence (approximately 48 h).

Characterization of nanoparticles

Photoluminescence evaluation was performed in acetonitrile-containing solution at room temperature in septum-capped, N₂-purged quartz cells using a Xe-doped mercury lamp, an Edinburgh FL3000 spectrofluorometer and a Czerny-Turner monochromator.

High resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) imaging and measurements were performed with JEOL JEM-2100F equipment under an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by applying a drop of the material suspended in ethanol onto a carbon-coated copper TEM grid and allowing it to dry at room temperature. X-ray photoelectron spectra (XPS) were measured on a SPECS spectrometer equipped with a Phoibos 150-MCD-9 detector and using a non-monochromatic Al K (1486.6 eV) X-ray source. Spectra were recorded at 200 °C, using an analyzer energy of 30 eV and an X-ray power of 50 W, and samples were evacuated into the spectrometer pre-chamber at 1×10^{-9} mbar. The measured intensity ratios of the components were obtained from the area of the corresponding peaks after Shirley-type nonlinear background subtraction, corrected by the transition function of the spectrometer. During data processing of the XPS spectra, the binding energy (BE) values were referenced to the C1s signal. The processing of the spectra was performed using CASA software.

With respect to the synthesis of the cerium oxide-gold nanoparticles, unless otherwise stated, the solvents and reagents were purchased from Aldrich and used as received. The synthesis of Au/CeO₂ was performed by impregnation of the gold catalysts onto the cerium oxide nanoparticles according to the following procedure. First, 5 g of CeO₂ was combined with a 0.90 g solution of NaAuCl₄ in 40 ml H₂O (milliQ). The suspension was stirred for 12 h at room temperature, after which all of the liquid was evaporated, and the solid was dried at 100 °C for 3 h. The solid was then reduced and activated by pouring it into boiling 1-phenylethanol (60 ml) at 160 °C for 3 h. The catalyst was then filtered and washed consecutively with water (exhaustive washes with 3 l of distilled water), acetone (100 ml) and diethyl ether (50 ml) and dried under vacuum at 100 °C for 2 h. XR fluorescence gold analysis revealed that the gold content was about 0.82 wt. %. Other Au/CeO₂ catalysts with higher gold concentrations were prepared following the above procedure but using larger amounts of NaAuCl₄.

Four batches of nanoparticles with varying amounts of gold (10, 4.4, 1.79 and 0.82), expressed as % of total weight, were prepared at the Instituto de Tecnología Química (ITQ, Valencia, Spain).

Dynamic evaluation of leukocyte-endothelium interactions.

First, we evaluated the anti-inflammatory capacity of different batches of nanoparticles with (10, 4.4, 1.79 and 0.82) % of gold, at the same concentration (0.02 mg/mL). 1.2 mL of the previously isolated PMN solution with a density of 10⁶ cells/mL in complete RPMI was used. Three to four days prior to the experiment, HUVEC primary cultures were prepared as described above. PMNs were passed along the HUVEC monolayer at a rate of 0.3 mL/min for 5 min and all events during this time were recorded. Rolling velocity of PMNs was assessed by measuring the time taken to travel 200 micrometers. PMN rolling flow was assessed over a period of 1 min and adhesion was determined by counting the number of PMN adhering to the endothelium in 5 separate fields over a period of at least 30 s.

Static evaluation of leukocyte-endothelium interactions.

First, PMN were isolated and labeled with 2 μM 2', 7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5(y-6) carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a final concentration of 2x10⁶ cells/mL. Simultaneously, HUVECs were seeded in 96-well culture plates (Costar) and cultured until they reached confluence. 3 hours before the assay, HUVECs were treated with DMSO (0.141 M), TNF-α (5 ng/mL) and Au/CeO₂ nanoparticles (0.02 mg/mL). HUVECs were then washed once with RPMI + 1 % fetal bovine serum (FBS) and 100 μL of BCECF-AM-labeled PMN suspension was added to each well, allowing PMNs and HUVECs to

interact for 45 min. PMNs were then removed and each well was washed three times with HBSS to remove unattached PMNs. Finally, the contents of the wells were solubilized in 150 μ l lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS in water, pH 8.2-8.4) and the plates were measured with the Synergy Mx microplate reader (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany).

Cell viability and proliferation

For this assay, U937 cells (ATCC® CRL1593.2™) were seeded in 24-well plates at 100,000 cells/well in RPMI medium supplemented with 10 % FBS. Once confluence was reached, treatment with Au/CeO₂ or DMSO was administered for 3 h, after which the medium was refreshed, and the cells were allowed to proliferate for 3 days. At 24, 48 and 72 h cells were analyzed with the LUNA-FL counter to assess cell number and viability (double staining with acridine orange and propidium iodide). All treatments and measurements were performed in triplicate.

Evaluation of cell apoptosis

For apoptosis measurement, U937 cells were seeded in 24-well plates at 500,000 cells/well in RPMI supplemented with 10 % FBS. Treatment with Au/CeO₂ or DMSO was administered for 3 h, after which the medium was renewed, and the cells were cultured for an additional 21 h. The known apoptosis inducer staurosporine (STS) was used as a positive control for cell death. The FITC Annexin V apoptosis detection kit (FITC Annexin V) (BD Biosciences, CA, USA) was used for the assay. Cells were washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in binding buffer (provided by the kit) at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Subsequently, 100 μ L of the solution (1×10^5 cells) was transferred to a 5 mL culture tube, to which 5 μ L of FITC Annexin V and 5 μ L of propidium iodide were added. The presence of four populations was assessed: apoptotic (AnnV+/PI-), vital (AnnV-/PI-), late apoptotic/necrotic (AnnV+/PI+) and damaged cells (AnnV-/PI+).

Measurement of total ROS production

PMNs were seeded in 48-well plates and treated after 24 h with the nanoparticles at a concentration of 0.02 mg/mL for 3 h. Total ROS production was assessed by fluorescence (IX81 Olympus, Hamburg, Germany) after 30 min incubation in HBSS (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Sant Cugat del Vallés, Spain) with 5 μ M Hoechst 33342 (for nuclei) and 5 μ M 2'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA for ROS) (both from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Cells were washed twice with HBSS and a total of 20-30 images per well were recorded

with a fluorescence microscope coupled to static cytometry software ("ScanR" version 2.03.2, IX81 Olympus). Controls were performed using HBSS.

Protein expression analysis

First, PMNs were isolated as described previously and resuspended in a final concentration of 1×10^6 cells/mL. Simultaneously, HUVECs were seeded in 25 cm flasks² and cultured until they reached preconfluence. 3 h before the assay, HUVECs were treated with 0.82 % Au/CeO₂ nanoparticles (0.02 mg/mL). Subsequently, 5 mL of the PMN suspension was added to each flask and allowed to interact with HUVECs for 3 h. After this time, the PMNs and HUVECs were stored separately. The HUVEC pellets were then incubated in RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific,) with protease inhibitor cocktail (St. Louis, MO, USA). The tubes were then vortexed and sonicated 3 times, for 10 sec each time, to rupture the cell membranes, and centrifuged at $14000 \times g$ for 15 min. Supernatants were stored at -80°C for later use. A BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) was used to determine protein concentration and 25 μg of protein per sample was loaded onto 4-20 % polyacrylamide-SDS gels. Gel electrophoresis was carried out at 150 V, for 90 min, and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 400 mAp for 1 h. The membranes were then blocked RT for 1 h in 5 % nonfat milk in TBS-T buffer containing 150 mM sodium chloride, 0.1 % Tween20 and 25 mM Tris at pH 7.5. After removing excess blocking buffer, the membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-NF- κB antibody (Abcam, Cambridge, UK) and mouse polyclonal anti-actin antibody (Cell Signaling, Massachusetts, USA.), and subsequently with secondary antibodies conjugated with goat anti-rabbit horseradish peroxidase (Millipore Iberica, Madrid, Spain) or goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), as appropriate, for 1 h at RT. After removal of excess antibody, protein expression was assessed with an ECL plus reagent (GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont, UK) or Supersignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) using the Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) for chemiluminescence signal detection. Data were analyzed by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). All protein expression values were normalized with respect to those of actin in the same sample and with respect to the internal control included in each assay.

Statistical analysis

All data analyses were performed with SPSS 25.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA). Results for parametric and nonparametric variables were expressed as mean $\pm$ SD and median $\pm$ (25th-75th percentiles), respectively. Statistical analysis was performed with a Student's t-test

for normally distributed data, a Mann-Whitney U-test for non-normally distributed values and a chi-square test for frequency ratio. In addition, the influence of BMI on biochemical parameters was assessed with a univariate general linear model using BMI as a covariate. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Graphs were made with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

1. Effect of metformin on mitochondrial function and mitophagy in PBMCs from patients with T2D.

Anthropometric and biochemical parameters

First, we evaluated alterations in the anthropometric and biochemical measurements of our cohort, which showed typical features of T2D. Regarding anthropometric measures, we observed metabolic alterations characteristic of T2D, such as higher BMI, waist circumference, and waist-to-hip ratio, all signs of overweight or obesity. Overweight is usually related to hypertension, as observed in our population of type 2 diabetics, who showed significantly higher SBP and DBP than the control population. In relation to insulin metabolism parameters, type 2 diabetic patients displayed higher insulin and HOMA-IR index levels than our healthy subjects. This is consistent with classical features of T2D; in fact, our type 2 diabetic patients also showed higher %HbA_{1c} and glucose than the non-diabetic subjects. In parallel to the alterations in glucose metabolism, disturbances in lipid metabolism were also observed, though some of the alterations were attributed to statin treatment. In this regard, cholesterol and LDL levels were lower in type 2 diabetic patients, probably due to the hypolipidemic effect of statins. However, HDL levels were lower and VLDL and triglyceride levels were higher in patients with T2D, partly reflecting the classic hyperlipidemic alterations that can lead to atherogenic dyslipidemia. Treatment of type 2 diabetic patients with metformin reduced HbA_{1c}, thus demonstrating its marked capacity to lower glycaemia and long-term glucose-related alterations.

The statistical analysis was adjusted to evaluate the influence of BMI and age on the parameters analyzed, as well as the reduction in HbA_{1c} observed after treatment with metformin, and the differences were confirmed to be significant. Therefore, we can affirm that age, BMI, and percentage of HbA_{1c} were independent factors that did not influence the rest of the data measured.

Effect of T2D and metformin on ETC and oxidative balance in PBMCs.

The oxidative phosphorylation process, in which ETC complexes are implicated, is vital for cellular homeostasis. We evaluated the levels of the different protein complexes that compose the ETC and a voltage-dependent anion channel (VDAC). VDAC expression did not change in any of the groups. ETC complexes, except for complex IV, showed a similar effect: their expression was reduced in leukocytes from type 2 diabetic patients, whereas in leukocytes from type 2 diabetic patients treated with metformin the levels were comparable to those in leukocytes from healthy subjects and higher than those in type 2 diabetic patients without metformin treatment.

Alterations of function in ETC often lead to excess mitochondrial ROS production. Therefore, we measured this parameter using the MitoSOX fluorescence probe and observed that leukocyte mitochondria from type 2 diabetic patients had more ROS ($p < 0.05$) than those from control subjects, and that metformin treatment caused mitochondrial ROS levels to be fully restored ($p < 0.001$).

Altered mitophagy markers in patients with T2D and effect of metformin

Next, we explored the effects of metformin on mitochondrial quality, for which we evaluated the protein expression of several markers of mitophagy and mitochondrial biogenesis. Protein levels of PINK1 and Parkin, two initiators of mitophagy, were reduced in leukocytes from type 2 diabetic patients ($p < 0.05$). We also analyzed the mitophagy cargo protein NBR1, whose protein levels were not altered in leukocytes of type 2 diabetic patients. In metformin-treated patients, the expression of PINK1, Parkin and NBR1 was significantly higher than in untreated patients ($p < 0.05$). Protein levels of another mitophagy initiation protein, BNIP3L/NIX, did not differ among the three groups, suggesting that this pathway is not significantly altered in leukocytes of type 2 diabetic patients.

In addition, we evaluated mTFA levels and observed a marked, but not significant, increase in the expression of this protein in type 2 diabetic patients. This increase was significantly reduced by metformin ($p < 0.05$). Furthermore, with the aim of evaluating mitochondrial biogenesis, we analyzed PGC1 α and observed that its levels were markedly decreased in the leukocytes of type 2 diabetic patients ($p < 0.05$), while those of patients treated with metformin showed a significant increase ($p < 0.01$).

We also analyzed levels of AMPK, a key master regulator of energy. We observed a marked decrease in protein levels of phosphorylated and total AMPK in leukocytes from type 2 diabetic patients ($p < 0.05$). However, leukocytes from patients treated with metformin displayed significantly higher protein levels of phosphorylated and total AMPK ($p < 0.05$).

Effect of metformin on mitochondrial morphology in PBMCs from patients with T2D

Since our type 2 diabetic patients exhibited altered mitochondrial quality control markers, we also decided to evaluate mitochondrial morphology by TEM. We observed that PBMCs from type 2 diabetics presented larger mitochondria, with larger area ($p < 0.001$) and perimeter ($p < 0.001$) and lower circularity ($p < 0.001$) compared to those from healthy subjects. Roundness and aspect ratio, which indicate interconnection between mitochondria, did not change significantly between subjects with T2D and controls.

Additionally, we observed that mitochondria from metformin-treated patients had smaller area ($p < 0.001$) and perimeter ($p < 0.001$) than those from type 2 diabetic patients who had not received metformin and healthy subjects ($p < 0.05$ for area, and $p < 0.001$ for perimeter). In addition, roundness ($p < 0.001$ vs. T2D and $p < 0.001$ vs. control) and circularity ($p < 0.001$ vs. T2D and $p = 0.027$ vs. control) were higher than in the other two groups, while aspect ratio was significantly reduced ($p < 0.001$ vs. both groups).

Metformin reduces TNF- α and IL-6 levels in type 2 diabetic patients

Finally, we explored levels of TNF α and IL-6, markers of inflammatory status in T2D, and observed that both were increased in the serum of patients. In the case of patients treated with metformin, TNF- α and IL-6 levels were significantly lower than those of subjects not receiving metformin. Since these cytokines are proinflammatory, our findings provide further evidence of the role of inflammation in the development of T2D and the inflammatory effects of the metformin treatment.

2. Effect of gold nanoparticles/cerium oxide on leukocyte-endothelium interaction, inflammation, and autophagy in T2D.

Synthesis of Gold/Cerium Oxide Nanoparticles

Preparation of gold catalysts on CeO₂ nanoparticles by impregnation was carried out through the procedure described below, resulting in 4 batches with different Au concentration: 0.82, 1.79, 4.4 and 10 % by weight. The Au/CeO₂ catalysts were prepared by impregnating 5 g of CeO₂ with a 0.90 g solution of sodium tetrachloroaurate (NaAuCl₄) in 40 mL of H₂O (milliQ). The suspension was stirred for 12 h at room temperature, after which all the liquid was allowed to evaporate. The remaining solid was dried at 100 °C for 3 h, then reduced and activated by pouring it into boiling 1-phenylethanol (at 160 °C), where it was kept for 3 h. The catalyst was then filtered and washed consecutively with water (exhaustive washes with distilled water: 3 L), acetone (100 mL) and diethyl ether (50 mL) and dried under vacuum at 100 °C for 2 h. For the

following assays, we focused on nanoparticles containing 0.82 wt. % Au to explore their properties, biocompatibility, and anti-inflammatory effects. HR-TEM and STEM analyses were performed on a sample of the Au/CeO₂ nanoparticles₂ 0.82 wt. % Au. Due to the high atomic weight of CeO₂, it is difficult to visualize the Au crystallites and to create an accurate particle size histogram. Next, we performed dark-field scanning electron microscopy of the 0.82 wt. % AuCeO₂ catalyst and elemental mapping by X-ray dispersive spectroscopy (EDX). Elemental mapping at the microscopic level of this catalyst revealed a homogeneous dispersion of Au on the CeO₂ support in a 0.82 wt. % Au/CeO₂ sample, i.e., the two compounds were distributed similarly.

Next, we performed new analyses by HR-STEM with the objective of characterizing the average size of the nanoparticles with 0.82 % gold, obtaining an average diameter of 3.94 nm. We also analyzed the average size of the nanoparticles with 1.79 % gold by weight, obtaining a value of 6.04 nm. To finalize the characterization of the nanoparticles we performed an analysis by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to determine the nature and chemical state of the atoms present in the formulation.

Anthropometric and biochemical parameters

Patients with T2D had an altered glucose metabolism with respect to the control group. Glucose, insulin, HOMA-IR and HbA_{1c} levels were significantly higher than controls ($p < 0.001$). In addition, higher values of upper waist circumference ($p < 0.001$), BMI, weight and hs-CRP were observed in the T2D group ($p < 0.001$). Regarding lipid profile, our T2D patients were characterized by lower HDL ($p < 0.001$) and higher triglyceride concentration ($p < 0.001$). However, due to the presence of hypolipidemic treatment with statins (64 % of the diabetic population), levels of total cholesterol ($p < 0.001$) and LDL-c ($p < 0.001$) were slightly lower. When statistical significance was recalculated after adjusting for BMI, all differences between parameters remained statistically significant, except for triglycerides and hs-CRP.

Leukocyte-endothelium interactions

It is known that levels of many proinflammatory markers are increased in patients with metabolic disorders. Therefore, we evaluated the influence of T2D and Au/CeO₂ nanoparticles on the interaction of PMNs with the endothelial monolayer, one of their main functions. We observed a reduction in PMN rolling velocity ($p < 0.001$), along with an increase in leukocyte adhesion ($p < 0.05$) and rolling flux ($p < 0.01$), in diabetic patients with respect to control individuals. Treatment with cerium oxide nanoparticles containing 10, 4.4 and 1.79 wt. % Au did not modify these effects. However, treatment with the nanoparticles containing 0.82 wt. % Au

reversed the observed effects on leukocyte rolling velocity ($p<0.05$), rolling flux ($p<0.05$) and leukocyte adhesion ($p<0.05$).

Therefore, since the effect of Au/CeO₂ on leukocyte-endothelium interaction was only observed with 0.82 wt. % Au and nanoparticles with higher Au proportion (1.79, 4.4 or 10 wt. %) lacked effect, we performed the rest of the experiments with 0.82 wt. % Au nanoparticles.

To further explore the interactions between leukocytes and endothelial cells, we performed a static interaction assay. As expected, the data showed a significant increase in leukocyte adhesion when HUVECs were stimulated with TNF- α (5 ng/mL) ($p<0.01$). This condition was used as a positive control for adhesion. DMSO did not alter leukocyte adhesion in unstimulated or stimulated HUVECs. Interestingly, treatment with 0.82 wt. % Au/CeO₂ nanoparticles (0.02 mg/mL for 3 h) reversed TNF- α -induced adhesion, resulting in values similar to those of unstimulated cells.

Biocompatibility of Au/CeO₂ nanoparticles

When exploring the effects of an antioxidant agent, especially in the case of metallic nanoparticles, it is crucial to evaluate their biocompatibility. For this purpose, we used the U937 cell line (human leukocytes) to evaluate the following parameters: (i) cell viability, (ii) proliferation and (iii) induction of apoptosis. Regarding the viability and proliferation assay, cells treated with DMSO or 0.82 wt. % Au/CeO₂ showed a multiplication rate like that of untreated cells, maintaining the same proliferation percentages. Viability was not affected by either treatment.

These results were confirmed by specifically studying apoptosis via an assay using Annexin V (AnV) and propidium iodide (PI). Four different cell subpopulations were evaluated: Vital (AnV⁻/PI⁻), apoptotic (AnV⁺/PI⁻), late apoptotic (AnV⁺/PI⁺) and necrotic (AnV⁺/PI⁺). Staurosporine (STS) was employed as a positive control for apoptosis. Almost 85% of STS-treated cells showed apoptotic features compared to 15 % of the negative control (untreated cells). The portion of apoptotic cells treated with vehicle (DMSO) and Au/CeO₂ were similar (16.2 % and 17.4 % respectively) and did not differ with respect to untreated cells. These results revealed no increase in the proportion of apoptotic or necrotic cells due to treatment with any of the particles tested.

Therefore, our cell toxicity analysis has revealed that 0.82 wt % Au nanoparticles do not compromise cell viability. This is in line with previously published data showing that Au-

supported CeO₂ nanoparticles possess a high degree of biocompatibility with RAW 264.7 macrophage cells.

ROS production and NF-κB levels

We examined ROS levels by fluorescence and observed that leukocytes from T2D patients showed a higher amount of ROS compared to those from control subjects ($p < 0.05$). Furthermore, treatment with Au/CeO₂ containing 0.82 wt. % Au significantly reduced ROS levels ($p < 0.05$).

As mentioned above, metabolic disorders produce a general proinflammatory state. In this regard, we examined the early cellular immune response by analyzing the protein expression of NF-κB (p65 subunit). HUVECs incubated with PMNs from T2D patients showed an increased amount of p65 compared to those incubated with PMNs from control subjects ($p < 0.05$). Furthermore, treatment with Au/CeO₂ containing 0.82 wt. % Au significantly prevented increased NF-κB (p65) expression ($p < 0.05$), suggesting a protective anti-inflammatory effect of Au/CeO₂ nanoparticles.

Autophagy

In terms of the autophagic process, we examined the protein levels of numerous mediators of said process. We found that the expression of ATG5 (dimerized with ATG12), ATG7 and LC3 proteins was increased in HUVECs from individuals with T2D when compared to the control group ($p < 0.05$). Treatment with Au/CeO₂ significantly reduced the levels of all of them. As for LAMP2 protein, which is implicated in autophagosome and lysosome fusion, we found a non-significant upward trend when comparing controls with diabetics, while treatment with Au/CeO₂ showed a non-significant trend towards lower expression levels.

DISCUSSION

1. Effect of metformin on mitochondrial function and mitophagy in PBMCs from patients with T2D

Metformin is a biguanide used as a first-line treatment for T2D. Numerous studies have demonstrated the benefits of metformin on different parameters, such as glucose levels, insulin and HOMA-IR index. In the present study, the cohort of type 2 diabetic patients showed typical alterations in clinical parameters with respect to controls; specifically, in BMI, waist circumference, waist-to-hip ratio, SBP, insulin, HOMA-IR, and glucose. Metformin treatment reduced glucose and HbA_{1c} %, in line with previous studies. Regarding lipid parameters, type 2 diabetic patients showed an increase in VLDL and triglyceride levels, but a reduction in

cholesterol, HDL, and LDL levels. These results are in accordance with previous evidence showing this effect to be a consequence of lipid-lowering treatment in these patients and independent (or not) of metformin treatment.

In addition to the biochemical alterations described, we observed an increase in mitochondrial ROS, reflecting the findings of previous research. In this regard, it is important to note that, although ROS can act as cellular signals, excess levels are a sign of cellular stress and can lead to the activation of inflammatory pathways. As discussed above, T2D also curses with mitochondrial dysfunction, which is in turn associated with chronic hyperglycaemia and hyperlipidaemia. Therefore, we evaluated the possible beneficial effects of metformin by exploring its hypoglycaemic capacity and its possible effect on mitochondrial dysfunction. As expected, metformin demonstrated beneficial effects in type 2 diabetic patients through its ability to reduce mitochondrial ROS.

T2D has also been associated with altered mitochondrial complexes. In fact, mitochondrial abnormalities have been described in the hind limb skeletal muscle of diabetic mice fed high-fat diets, including decreased ADP-stimulated respiration, ETC complexes I and III activity and mitochondrial density. Another study showed that ETC complexes I and IV activity and expression levels were decreased in mitochondria from right atrial tissue of type 2 diabetic patients. In this part of our study, we have shown that VDAC expression did not change, but we did observe that the levels of ETC complexes I, II, III and IV were lower in T2D, thereby underlining a relationship between T2D and mitochondrial alteration. Moreover, these effects were reversed by metformin, thus supporting a beneficial action on mitochondrial function. Metformin can activate the AMPK regulator in hepatocytes and skeletal muscle, leading to decreased glucose production by the liver and increased glucose levels in skeletal muscle. Metformin has also been shown to increase glucose transporter 4 expression in the soleus muscle of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats; and one study reported that metformin treatment of STZ-induced diabetic mice attenuated atherosclerosis by decreasing endothelial mitochondrial fission and mitochondrial ROS.

Under physiological conditions, adequate ROS levels trigger different cellular defense mechanisms, such as upregulation of antioxidants and autophagy, and these mechanisms protect the cell from oxidative stress-mediated injury. However, when ROS levels are elevated, an imbalance in ROS production results in the accumulation of dysfunctional mitochondria within the cell, thus compromising its viability and functionality. Furthermore, increased ROS generation leads to the accumulation of mitochondrial DNA mutations, which promotes the

formation and aggregation of "mitophagy-resistant" mitochondria. In this regard, the presence of dysfunctional mitochondria has been shown to be associated with decreased insulin sensitivity and impaired insulin synthesis and secretion from pancreatic β -cells, which in turn contributes to the progression to T2D. In this part of the study, we report decreased PINK1 and Parkin protein levels in T2D, which points to impaired mitophagy, although no changes in NBR1, BNIP3/NIX and mTFA were found. Consistent with these data, significant down-regulation of PINK1 transcripts has been observed in skeletal muscle biopsies obtained from type 2 diabetic patients, and reduced mRNA expression of mitofusin 2 (MFN2), Parkin and PINK1 has been reported in patients with diabetic nephropathy.

We also observed a decrease in PGC1 α and AMPK-P in T2D, proteins with key functions in oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis. A similar decrease has been observed in the vastus lateralis of type 2 diabetic patients when compared with controls with no family history of diabetes mellitus. It is important to highlight that a decrease in the expression of PGC1 α -responsive genes involves a decrease in fatty acid oxidation, glycolysis, the tricarboxylic acid cycle, and ETC genes. Metformin reversed the downregulation of PGC1 α in our patients, in line with previously published studies, thus demonstrating that metformin induces PGC1 α expression and selectively affects hepatic PGC1 α functions.

Additionally, we evaluated mitochondrial quality in T2D by TEM analysis and found no significant alterations. Leukocytes from our type 2 diabetic patients showed mitochondrial alterations, such as increased size, increased area and perimeter, and reduced circularity. These results might seem contradictory to those previously reported in T2D, which support increased mitochondrial fission. However, the increase in mitochondrial size may be explained by the formation of megamitochondria, swollen mitochondria caused by enhanced mitochondrial dysfunction, and are not processed by the traditional fission mechanism. These altered mitochondria have been previously described in pancreatic β -cells from rats with T2D and in podocytes from murine and *in vitro* models of T2D. Therefore, increased fusion could coexist with the presence of megamitochondria, reinforcing the idea that mitochondrial dysfunction is a feature of T2D-affected leukocytes. Further studies are needed to clarify whether the mitochondria present in leukocytes from the type 2 diabetic patients in our study are megamitochondria. In contrast, the mitochondria of metformin-treated patients did not exhibit this altered morphology but had a smaller area and perimeter than those of untreated patients and healthy subjects.

Finally, we also observed that levels of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were significantly higher in patients with T2D. However, this increase was reversed after treatment with metformin. There is evidence that excessive TNF- α release after leukocyte activation by oxidative stress inhibits insulin signaling and release while impairing glucose uptake. These results are in accordance with those reported by other studies demonstrating how metformin significantly reduced the levels of several proinflammatory cytokines in systemic circulation of patients with T2D. Thus, our results provide further evidence of the role of these cytokines in the development of T2D and how metformin can help modulate them.

2. Effect of gold nanoparticles/cerium oxide on leukocyte-endothelium interaction, inflammation, and autophagy in T2D.

The use of nanoparticles for therapeutic purposes is an effective and rapidly expanding approach to creating new formulations for the treatment of various human diseases, including T2D. In biomedical applications, gold nanoparticles are among the most promising nanoparticles.

Although the etiology of insulin resistance and T2D is intricate, different studies have reported that ROS can induce oxidative stress and thus exacerbate insulin resistance, highlighting the therapeutic potential of antioxidants. In this regard, there is abundant evidence, both *in vitro* and *in vivo*, supporting the potential of gold nanoparticles as antioxidants in models of T2D, among others. On the other hand, a similar ROS scavenging capacity has also been proposed for other metallic elements, such as cerium oxide. In this case, we used a combination of gold nanoparticles supported on cerium oxide nanoparticles (Au/CeO₂) due to their already known antioxidant action. In this same study Au/CeO₂ nanoparticles were shown to have better ROS removal activity, higher biocompatibility, and peroxidase activity than "plain" CeO₂ nanoparticles. However, the beneficial effect of gold nanoparticles deposited on cerium oxide in the context of T2D had not been addressed so far. Therefore, in this part of the doctoral thesis we focused on describing the generation of Au/CeO₂ nanoparticles and evaluated their antioxidant and anti-inflammatory properties in the context of T2D using an *in vitro* approach.

The synthesis process of the nanoparticles was carried out at the Institute of Chemical Technology (ITQ) of the Polytechnic University of Valencia in the group of Professor Hermenegildo García. To ensure an adequate quality of the product, HR-TEM, EDX and XPS tests were carried out and confirmed that the nanoparticles had a homogeneous distribution of gold throughout the cerium oxide and a desirable percentage of gold, and that the nature and chemical state of the atoms present in the formulation were correct.

The cohort of patients selected for this study showed characteristic features of the T2D population with altered glycaemic and lipid metabolisms when compared to the control population. Once again, hypolipidemic treatment with statins resulted in lower LDL, HDL, and total cholesterol levels in the type 2 diabetic population. It should also be noted that the statistically significant differences in hs-CRP and triglyceride parameters between the two populations disappeared after analyzing their relationship with BMI. Therefore, we can affirm that these two parameters depend to a greater extent on the height and weight of the individual than on the existence of T2D.

Regarding the action of gold-cerium oxide nanoparticles, an effect on leukocyte-endothelium interaction was only observed when the formulation had a gold percentage of 0.82 wt. %, while nanoparticles with a higher proportion of gold (1.79, 4.4 or 10.8 %) had no effect. The reasons for this lack of effect are not clear, but we can speculate that particles with different amounts of Au penetrate cell membranes to different extents, thus affecting their biological activity. Another possible explanation is that the presence of large amounts of gold may alter the ability of the cerium oxide to provide adequate support to optimize the oxide-reducing properties of the assembly, thus affecting its catalytic activity.

Importantly, cell toxicity studies have revealed that 0.82 wt. % Au nanoparticles do not compromise cell viability. This is in line with previously published data showing that CeO₂-supported Au nanoparticles possess a high degree of biocompatibility with RAW 264.7 cell line macrophages. Multiple targets could be involved in the antioxidant and anti-inflammatory effects of Au/CeO₂ nanoparticles on the leukocyte-endothelium system. For example, CeO₂ nanoparticles have been described to reduce ROS production and iNOS protein levels in stimulated macrophages, or to decrease mRNA levels of several inflammatory markers, such as IL-8, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), in human aortic endothelial cells (HAECs). In this regard, ROS may play a key role in hyperglycaemia-mediated endothelial deterioration and vascular complications associated with insulin resistance and T2D. Indeed, patients with T2D have been shown to run an increased risk of developing cardiovascular events, which is probably related to mitochondrial ROS production and oxidative stress. In this context, the results of the present study confirm that treatment with Au/CeO₂ at 0.82 % reduces ROS levels, pointing to a beneficial antioxidant effect in T2D. These results are in line with other studies that have demonstrated the antioxidant capacity of Au/CeO₂ in HeLa cells.

Regarding the potential anti-inflammatory effects of cerium gold-oxide nanoparticles, it is relevant that T2D is closely related to inflammation and the presence of proinflammatory cytokines. As we have already commented on, a state of chronic low-grade inflammation exists in diabetic individuals, with NF- κ B being highly implicated in this state. In the presence of certain proinflammatory cytokines (mainly TNF- α), activation of IKK kinase occurs, which phosphorylates I κ B inhibitors and allows NF- κ B activation. In fact, NF- κ B has been shown to be elevated in leukocytes from type 2 diabetic patients, thus highlighting the importance of this transcription factor in the leukocyte inflammatory response in T2D. In line with these data, our experiments indicated that HUVECs in the presence of leukocytes from T2D patients also increase NF- κ B expression. Furthermore, we found that treatment with Au/CeO₂ nanoparticles 0.82 % prevented the increase of NF- κ B, suggesting an anti-inflammatory role of these nanoparticles in T2D. In this sense, it has been shown that other antioxidant compounds, such as MitoQ or MitoTempol, can protect leukocytes and pancreatic β -cells against oxidative stress by decreasing NF- κ B activity and promoting their survival in T2D.

Regarding autophagy, its state of activation or inhibition is highly dependent on the metabolic state and cell type, even more so in the presence of a metabolic disease such as T2D. In any case, there is no doubt that dysregulation of the autophagic process is one of the main actors in the pathophysiology of T2D. In this study, we decided to analyze the status of autophagy in HUVECs that had been stimulated by PMNs from individuals with T2D. On the one hand, we found that ATG5 protein expression (dimerized with ATG12) was elevated in endothelial cells after stimulation with PMN from diabetic patients, an increase that was not present in HUVEC that had been in contact with PMN from healthy individuals. This implies a possible increase in the activity of the ATG12 conjugation system, closely related to phagophore formation due to its involvement in the recruitment and insertion of the LC3/GABARAPs conjugation system in the double membrane. On the other hand, we also observed an increase in the amount of total LC3, this being the sum of its complete form, of the protein resulting after ATG4-mediated proteolytic cleavage and of its PE-conjugated form. This result also suggests an increase in the LC3/GABARAPs conjugation system, one of the main markers of autophagic activation, since it is maintained in the double membrane of the phagophore, autophagosome and autolysosome during the entire autophagy process. Finally, we also found an increase in ATG7 protein expression levels in PMN-activated endothelial cells from diabetic patients compared to their control counterparts. This increase is in line with the increase in ATG5-ATG12 and LC3 proteins of the ATG12 and LC3/GABARAPs conjugation systems, since ATG7 is involved in the assembly of both. In the ATG12 conjugation system, ATG7 catalyzes the adenylation

reaction of LC3-I by activating it prior to its transfer to ATG3 to mediate its binding to PE. On the other hand, ATG7 activates ATG12 in the dimerization process with ATG5, also important in the mechanism of LC3 lipidation.

There is no consensus regarding the role of autophagy in endothelial cells and its relationship with inflammation. Some research suggests that autophagy has a proinflammatory role while other studies support an anti-inflammatory role. For example, in a model of thrombin-induced inflammation in ATG7-deficient endothelial cells, it was observed that endothelial cells exhibited lower NF- κ B factor activity, resulting in a lower inflammatory state represented by lower levels of IL-6 and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1).

Overall, our findings provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms occurring in patients with T2D, especially in relation to leukocyte-endothelium interactions. Our data suggest that oxidative stress, overactivation of proinflammatory mechanisms, and concurrent dysregulation of autophagy contribute to a potentiation of the interactions between these cells, which in turn increases the risk of cardiovascular disease.

CONCLUSIONS

1. PBMCs from patients with T2D exhibit lower levels of protein expression in ETC complexes I, II, III and V and higher levels of mitochondrial ROS when compared to PBMCs from control patients. Regarding mitophagy, we observed a decrease in PINK1 and PARKIN markers, as well as a decrease in the mitochondrial biogenesis markers PGC1 α and AMPK. Thus, we believe that metformin treatment has a beneficial effect on mitochondrial function due to the fact that it significantly increases the expression of ETC complexes, mitophagy proteins PINK1 and PARKIN and the mitochondrial biogenesis proteins PGC1 α and AMPK while decreasing mitochondrial ROS levels.
2. Mitochondria from PBMCs of T2D patients present an increase in their area and perimeter and a decrease in their circularity when compared with mitochondria from controls. These effects on mitochondrial morphology are reversed after metformin treatment. Thus, the alteration of mitochondrial morphology observed in T2D is ameliorated by metformin. In parallel, increased expression of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in the serum of patients with T2D is also reduced by metformin.
3. After testing 4 gold concentrations on the CeO₂ support (0.82; 1.79; 4.4 and 10 wt. %) we can conclude that the only nanoparticles capable of reversing the leukocyte-endothelium

alterations observed in T2D are those with the lowest percentage of gold (0.82 %). Experimental characterization revealed a homogeneous distribution of gold, an average particle size of 3.94 nm and physicochemical properties in accordance with those expected of this formulation.

4. Au/CeO₂ nanoparticles 0.82 % can reduce the excess production of mitochondrial ROS observed in PMNs from T2D patients while reducing the overexpression of NF-κB in endothelial cells. Furthermore, treatment with Au/CeO₂ 0.82 % appears to reverse alterations in the autophagy of endothelial cells in contact with PMNs from individuals with T2D. Additionally, they show high biocompatibility in *in vitro* models.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes de tipo 2 (DM2) es un complejo desorden metabólico que se origina por defectos en el metabolismo glucídico. A veces referida como “diabetes no insulino dependiente” o “diabetes del adulto” representa entre el 90 y el 95 % de todos los pacientes diabéticos. Abarca a individuos con cierto nivel de deficiencia de insulina y aquellos con resistencia periférica a la insulina (1). La DM2 requiere monitorización continua y atención individualizada, dada su alta variabilidad entre pacientes dependiendo del estilo de vida, edad y la presencia de factores de riesgo. Además, se requiere un control exhaustivo, especialmente de los recién diagnosticados, para la reducción de complicaciones macrovasculares y microvasculares (2). así como en los que tienen altos niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}).

1.1.1 Diagnóstico

La DM2 se caracteriza por hiperglucemia e hiperlipidemia que suelen ir acompañadas por hiperinsulinemia en las fases tempranas de la enfermedad (3). Para su diagnóstico se suele recurrir a la determinación de los niveles de glucosa plasmática en ayunas; entendiéndose ayuno como la ausencia de aporte calórico durante al menos 8 horas. También a la medida de los niveles de HbA_{1c}, fuertemente asociados a la glucemia media de las 8-12 semanas anteriores (4). El tercer y último método recomendado por la Asociación Americana de la Diabetes consiste en la medida de glucosa plasmática tras dos horas desde la administración oral de 75 g de glucosa (1). Los criterios diagnósticos consisten en:

- Niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L)
- Niveles aleatorios de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)
- Valores de HbA_{1c} $\geq 6,5$ % (48 mmol/mol)
- Glucemia plasmática a las 2 horas de la prueba de sobrecarga oral a la glucosa ≥ 200 mg/dL

La DM2 suele ir precedida de una etapa prediabética, que se caracteriza por cierto grado de resistencia a la insulina, pero que carece de intolerancia severa a la glucosa no llegando a los criterios diagnósticos para ser considerada DM2. Estos pacientes presentan elevados niveles de glucosa plasmática en ayunas (entre 100 y 125 mg/dL), absorción deficiente de glucosa (de 140 a 199 mg/dL de glucosa plasmática tras la prueba de sobrecarga de glucosa) y valores de HbA_{1c} entre 5,7 y 6,4 %(1). También se debe monitorizar estos parámetros en individuos con factores de riesgo asociados al desarrollo de DM2 (parentesco de primer grado con individuos diabéticos,

obesidad, antecedentes de enfermedad cardiovascular, hipertensión, valores de lipoproteínas de alta densidad (HDL) < 35 mg/dL, niveles de triglicéridos > 250 mg/dL, síndrome de ovario poliquístico y etnias de alto riesgo) (1).

1.1.2 Epidemiología e impacto socioeconómico

El incremento global del estilo de vida sedentario, las dietas altamente calóricas y la obesidad resultante de ambas está suponiendo un aumento dramático del número de diagnósticos de DM2 (3). La incidencia mundial en el año 2021 se estimó en 537 millones de personas, esperándose un aumento hasta los 783 millones en el año 2045. Los gastos sanitarios asociados a la DM2 se estiman en 966 billones de dólares en el año 2021 y 1,054 billones de dólares predichos para el año 2045 (5). Con todo ello, no cabe duda de que la DM2 es una de las mayores amenazas a la salud pública de nuestro tiempo.

1.2 Fisiopatología

1.2.1 Homeostasis de la glucosa

La glucosa es una de las principales fuentes de energía del organismo. Proviene principalmente de la ingesta de alimentos, durante la cual moléculas complejas son digeridas, resultando en la liberación de carbohidratos simples. Por otro lado, los procesos de glucogenolisis y gluconeogénesis también aportan glucosa al organismo, especialmente cuando no hay ingesta alimentaria. En el cuerpo humano, existe una compleja red de hormonas y neuropéptidos que actúan en conjunto para controlar los niveles de glucosa en la sangre y mantenerlos dentro de un rango fisiológico estrecho, comprendido entre 4 y 6 milimol/L (4-6 mM). A este proceso se le conoce como homeostasis de la glucosa y en él participan órganos como el páncreas, intestino, hígado o cerebro, así como los tejidos muscular y adiposo (Figura 1). Durante el sueño o entre comidas, cuando los niveles de glucosa son bajos, las células alfa pancreáticas liberan glucagón, el cual promueve la glucogenolisis hepática. Además, el glucagón también estimula la gluconeogénesis renal y hepática, todo ello con el objetivo de mantener en rango fisiológico los niveles de glucosa (6). Por el contrario, las células beta pancreáticas liberan insulina como respuesta a elevadas concentraciones de glucosa, por ejemplo tras la ingesta alimentaria (7). Tras la unión con sus respectivos receptores del tejido muscular y adiposo, en la célula se inicia la absorción de glucosa dependiente de insulina mediante su captación desde el torrente sanguíneo (8).

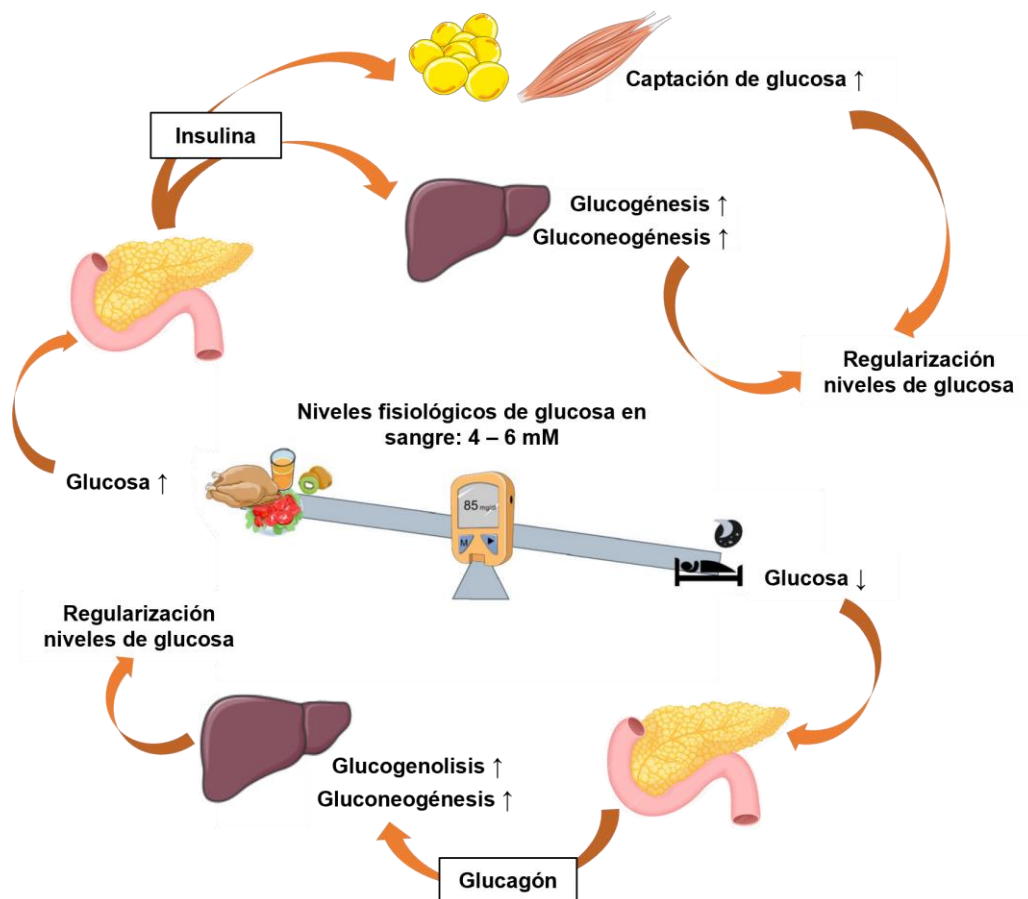


Figura 1. Homeostasis de la glucosa. Tras el descenso de los niveles plasmáticos de glucosa, las células alfa pancreáticas liberan glucagón, estimulando la gluconeogénesis y glucogenólisis logrando así mantener la concentración de glucosa en rango fisiológico. Por el contrario, cuando aumenta la glucemia, las células beta pancreáticas liberan insulina, activando la captación de glucosa en los tejidos periféricos y promoviendo la glucogénesis y gluconeogénesis equilibrando de nuevo los niveles de glucosa.

1.2.2 Ruta de señalización de la insulina

El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína ubicada en la membrana plasmática y está compuesto por cuatro subunidades (heterotetrámero). Las dos subunidades alfa se encuentran en el espacio extracelular y sirven de sitio de unión a la insulina. Las dos subunidades beta se encuentran insertadas en la membrana celular y se caracterizan por poseer dominios tirosina quinasa. Tras la unión de la insulina a las subunidades alfa, se produce un cambio conformacional que estabiliza el receptor y permite su autofosforilación en los dominios tirosina quinasa de las subunidades beta, iniciando la cascada de señalización de la insulina. Esta autofosforilación sirve de sitio de unión para los sustratos del receptor de insulina (IRS). La familia de los IRS comprende 4 miembros, aunque los más importantes para el transporte de glucosa son los IRS-1/2 (9). Así, los IRS son reclutados tras la activación del IR, se fosforilan, y

sirven de anclaje para otras proteínas que continúan la señalización de forma específica según el tejido y tipo celular. Dentro de estas, quizás la más estudiada es la ruta mediada por el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) que se acumula en la membrana plasmática tras la fosforilación de su precursor, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), por la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que necesita ser activada por IRS-1. La acumulación de PIP₃ permite el anclaje de la proteína quinasa B (PKB, también conocida como AKT) que se considera el efector central de las acciones de la insulina (10,11): promueve la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la superficie celular, favorece la síntesis de glucógeno mediante la acción sobre la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3) (12), participa en la acción anti-lipolítica de la insulina tras la fosforilación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) y en la reducción de los niveles de AMP cíclico (AMPC) (13) y está implicada en la síntesis proteica mediante la activación de la ruta de la diana de rapamicina en células de mamíferos mTORC1/p70S6K (14).

De especial relevancia son también los mecanismos de regulación que permiten frenar y modular la señalización de la insulina, evitando así una respuesta descontrolada. En este sentido, hay que destacar el papel de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) cuya función consiste en desfosforilar los residuos tirosina del IR o de los IRS, reduciendo así la transducción de señal (15). Por otro lado, existen otros mecanismos que fosforilan determinados residuos serina o treonina de los IRS evitando nuevamente su activación (14). Sin embargo, cuando estos mecanismos son activados de forma crónica (debido, entre otros, a la presencia de altos niveles de ácidos grasos libres o moléculas proinflamatorias) pueden favorecer la aparición de resistencia a la insulina.

1.2.3 Resistencia a la insulina

En condiciones normales existe una correcta señalización entre las células β pancreáticas y los tejidos sensibles a la insulina donde los procesos anteriormente descritos se encuentran en equilibrio, manteniendo la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, en determinadas ocasiones se produce un desbalance en estas interacciones, viéndose afectada la acción de la insulina sobre los tejidos diana, lo que se denomina resistencia a la insulina (16) (Figura 2). Así, las células pierden la capacidad de responder a la acción hipoglucemiante de la insulina, lo que resulta en una disminución de la captación de glucosa en los tejidos periféricos, principalmente en el tejido adiposo (17). En el tejido muscular encontramos defectos en la señalización por insulina, en el transporte y fosforilación de glucosa, en la síntesis de glucógeno, en la actividad piruvato deshidrogenasa y en la capacidad mitocondrial (18). En el hígado, la resistencia a la insulina sumada a una mayor sensibilidad al glucagón resulta en un aumento de

la gluconeogénesis y glucogenólisis lo que provoca el aumento de los niveles de glucosa en ayunas (19). También es importante mencionar que la resistencia a la insulina también afecta a otros tejidos y órganos. En el riñón, la falta de acción de la insulina junto con la gluconeogénesis renal aumentada contribuye a la hiperglucemia en ayunas (20). En el tejido vascular, la resistencia a la insulina bloquea, al menos parcialmente, el efecto vasodilatador de la insulina, y de esta manera puede disminuir el transporte y disponibilidad de insulina (y glucosa) aumentando la resistencia a la insulina (21).

Otra de las consecuencias de la resistencia a la insulina es la activación de la lipólisis en tejido adiposo, aumentándose los niveles de ácidos grasos libres (AGL) circulantes. Estos AGL terminan acumulándose en el músculo esquelético e hígado lo que a su vez, incrementa resistencia a la insulina (22).

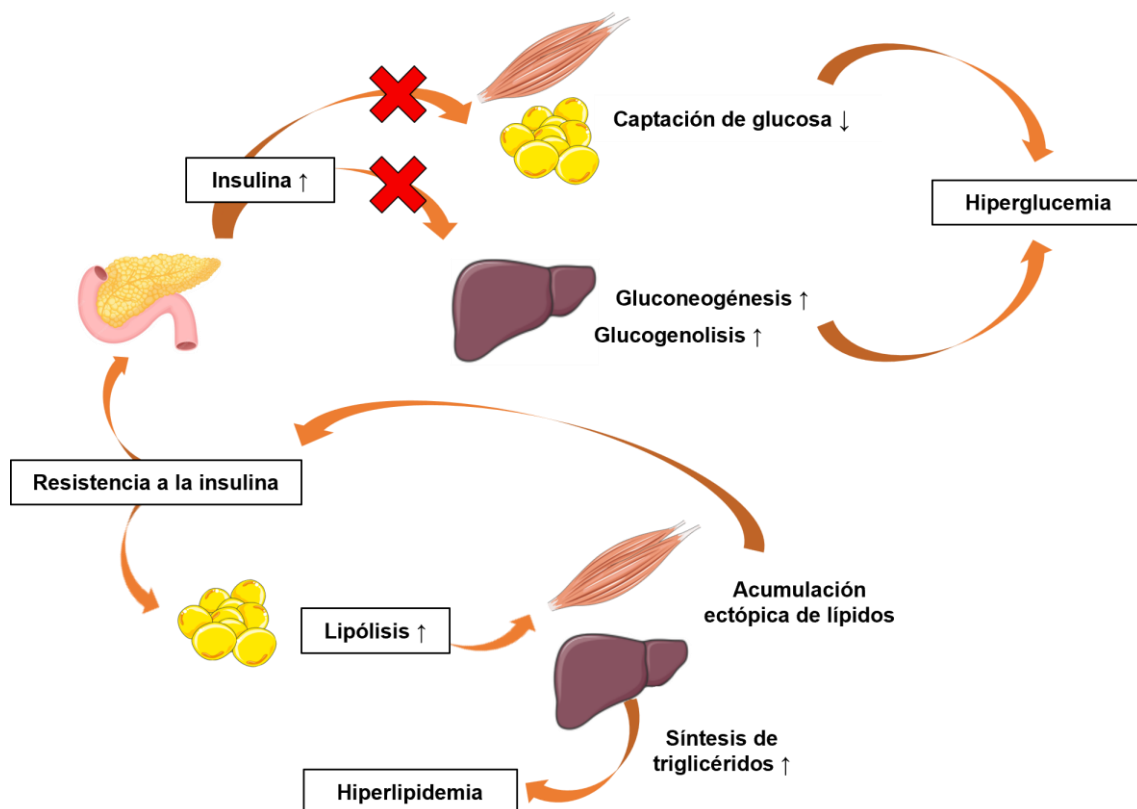


Figura 2. Mecanismos asociados a la resistencia a la insulina. Cuando el efecto de la insulina se encuentra alterado, el páncreas aumenta su producción y liberación como mecanismo compensatorio. Sin embargo, la resistencia a la insulina en hígado y tejidos periféricos acarrea una señalización deficiente que tienen como consecuencia la hiperglucemia. Por otro lado, la falta de acción de la insulina en el tejido adiposo favorece la lipólisis, lo que agrava la resistencia a la insulina.

1.2.4 Disfunción de la célula beta pancreática

Bajo condiciones de hiperglucemia, las células beta pancreáticas se expanden y proliferan en un intento de regularizar los niveles de glucosa mediante el aumento de la secreción de insulina. Sin embargo, cuando esta situación se mantiene en el tiempo de forma crónica, la hiperglucemia genera hiperinsulinemia y finalmente glucotoxicidad. La especial sensibilidad de la célula beta a estas condiciones de estrés (23,24) sumado al gradual agotamiento por la creciente demanda de insulina resulta en la incapacidad de la célula beta para secretar suficiente insulina que mantenga los niveles de glucosa dentro del rango fisiológico. En este punto, la excesiva carga metabólica, sumada a las condiciones de estrés en las que se encuentra, desencadenan en la célula beta procesos perjudiciales y, en última estancia, apoptosis (25). Por todo ello, se sabe que la disfunción de la célula beta juega un papel principal en el desarrollo y la fisiopatología de la DM2. Se ha observado que el páncreas de los pacientes con DM2 presentan una reducción de un 40 % en su número total de células beta (26). Sin embargo, se ha demostrado que tras la reducción de los niveles de glucosa en sangre mediante diversos tratamientos (cirugía bariátrica o terapias de reducción glucídica) la secreción de insulina en ayunas y la secreción total de insulina en respuesta a glucosa fueron menores, aumentando de esta manera la sensibilidad de la célula beta (27). Estas evidencias científicas, demuestra que es improbable que el déficit y disfunción de células beta sea la única causa de la DM2 y que, incluso en la DM2, existen células beta pancreáticas vivas que, aunque en mayor o menor medida estén insensibilizadas, pueden ser recuperadas (28). Con todo ello y teniendo en cuenta el indiscutible papel que ejercen la disfunción de las células beta y la resistencia a la insulina sobre la patogénesis de la DM2, cuál de ellos es crítico para el desarrollo de la enfermedad o cuál aparece primero es objeto de gran controversia. En cualquier caso, está claro que el proceso de inicio y desarrollo de la DM2 es multifactorial donde influyen los procesos anteriormente comentados, así como otros componentes genéticos y ambientales.

1.3 Expresión clínica de la DM2

1.3.1 Hiperglucemia

En la DM2, debido principalmente a la resistencia a la insulina, los niveles de glucosa en ayunas están anormalmente elevados. Como se ha comentado anteriormente, tras la ingesta alimentaria se produce una señalización mediada por hormonas y otras moléculas cuya finalidad es la de mantener los niveles de glucosa dentro del rango fisiológico. La disfunción de estos sistemas es la causa de los elevados niveles de glucosa en ayunas. Con ello, es fundamental en el tratamiento de la DM2 y especialmente en la prevención de complicaciones microvasculares,

mantener unos niveles de glucosa adecuados. El parámetro más usado para evaluar el control glucémico es la HbA_{1c} ya que se considera una medida integral de la glucemia a largo plazo. Sin embargo, un nivel anormal de hemólisis podría afectar a la correcta interpretación de la medida. También una edad avanzada, pertenecer a raza no caucásica, alto consumo graso en la dieta, alcoholismo, tabaquismo, enfermedad de hígado o riñón y bajos niveles de hierro pueden afectar los niveles de HbA_{1c} con independencia de los niveles de glucemia (16).

El tratamiento y manejo de la DM2 se ve complicado por numerosas alteraciones fisiopatológicas, en lo relativo a la prevención de complicaciones microvasculares el principal objetivo es un adecuado control glucémico. El objetivo ideal consiste en reducir los niveles de HbA_{1c} por debajo del 6.5 % sin causar efectos adversos, de los cuales la hipoglucemia es el más preocupante (29,30). Estos niveles de HbA_{1c} corresponden a aquellos en los cuales los pacientes con DM2 no presentan mayor probabilidad de desarrollar retinopatía diabética (31) ni otras comorbilidades.

1.3.2 Sobrepeso y obesidad

Según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) el criterio usado para el diagnóstico de obesidad es la existencia de un porcentaje de grasa corporal superior al 25 % en hombres y al 33% en mujeres. Sin embargo, no siempre es posible determinar el porcentaje de grasa corporal, por ello se recurren a otras mediciones más simples pero reproducibles siendo la más común el índice de masa corporal (IMC). El IMC es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla y se considera la medida más utilizada en el mundo para el diagnóstico de obesidad. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la siguiente clasificación en función del valor del IMC: desnutrición para personas con un IMC menor a $18,5\text{kg}/\text{m}^2$; normopeso para aquellos con un IMC entre $18,5$ y $24,9\text{ kg}/\text{m}^2$; sobrepeso para aquellas personas con un IMC comprendido entre 25 y $29,9\text{ kg}/\text{m}^2$; obesidad grado I para personas con un IMC entre 30 y $34,9\text{ kg}/\text{m}^2$; obesidad grado II para aquellas personas que presenten un IMC entre 35 y $39,9\text{ kg}/\text{m}^2$ y obesidad grado III u obesidad mórbida para aquellos que presenten un IMC superior a $40\text{ kg}/\text{m}^2$.

Hay que destacar que la mayoría de los pacientes con DM2 presentan obesidad o sobrepeso en el momento de su diagnóstico. La inactividad física, junto con el excesivo consumo calórico y cierta predisposición genética son los principales factores relacionados al desarrollo de diabetes y obesidad. La obesidad es una enfermedad caracterizada por una acumulación excesiva de grasa que da lugar a desequilibrios metabólicos, especialmente resistencia a la

insulina, punto de encuentro entre obesidad y DM2. En este sentido hay que destacar que el tejido adiposo es un órgano metabólicamente activo con un papel muy importante en la homeostasis energética. En pacientes obesos, la capacidad hiperplásica del adipocito se altera, produciéndose una expansión y remodelación hipertrófica del tejido adiposo, ocasionando un aumento del tamaño de los adipocitos con la consiguiente pérdida de función (32).

Cuando se dan estas condiciones, el adipocito hipertrofiado va a presentar niveles elevados de lipólisis y movilización de ácidos grasos libres (AGL) hacia otros depósitos y órganos metabólicos (33). De especial importancia son el hígado y el tejido muscular donde los AGL, una vez activados tras su unión a la coenzima A, pueden ser oxidados en la mitocondria o almacenados. Sin embargo, cuando la capacidad de almacenamiento y oxidación se ve sobrepasada, los AGL y sus derivados se acumulan, desencadenando una serie de señales y respuestas que interfieren en la ruta de la insulina (34). Por ejemplo, a nivel muscular se produce un bloqueo del transporte de glucosa en respuesta a la insulina como consecuencia del aumento de los niveles de AGL plasmáticos (35). De igual forma, estos altos niveles de AGL pueden afectar negativamente a la acción de la insulina mediante la fosforilación de IRS-1 por parte de serina/treonina quinasas (36).

Aunque más adelante se tratará en mayor profundidad, hay que mencionar que con la obesidad se desarrolla un estado de inflamación crónico de bajo grado caracterizado por el aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, destacando el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). El aumento de esta citoquina proinflamatoria también afecta a la señalización de la insulina, inactivando y degradando IRS-1 (36).

1.3.3 Dislipidemia aterogénica

Se define dislipidemia aterogénica como una serie de alteraciones de los niveles sanguíneos de lípidos y lipoproteínas con potencial capacidad aterogénica. Se suelen clasificar en función de su origen, siendo las dislipidemias primarias aquellas que tienen un origen genético, o secundarias, aquellas asociadas a otras enfermedades. Como hemos comentado anteriormente, en la DM2, el metabolismo lipídico se ve alterado debido a la resistencia a la insulina. Así, en la dislipidemia diabética encontramos hipertrigliceridemia acompañada de una reducción en los niveles de HDL y un aumento en los niveles de lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL respectivamente), apolipoproteína B (ApoB) y AGL (37). Más en detalle, en condiciones de resistencia a la insulina existe una alteración de la lipólisis en el tejido adiposo que provoca la liberación de altos niveles de AGL a la par que se reduce la degradación hepática de la ApoB, principal constituyente proteico de LDL Y VLDL (38). Por otro

lado, la resistencia a la insulina induce la activación de enzimas lipogénicas en el hígado que, en el contexto de elevados niveles de AGL circulantes, catalizan una sobreproducción de VLDL enriquecidas en triglicéridos, altamente aterogénicas (39). El incremento de las VLDL ricas en triglicéridos produce un aumento de expresión en la proteína transferidora de ésteres de colesterol, la cual permite la transferencia de lípidos entre lipoproteínas (39). En este punto, las partículas de alta densidad ricas en colesterol (HDL) ceden ésteres de colesterol a las lipoproteínas de baja y muy baja densidad y, a su vez, estas transfieren triglicéridos a las HDL. Estos triglicéridos son rápidamente hidrolizados por la lipasa hepática, también elevada en pacientes con DM2. El resultado es, además del aumento de las lipoproteínas proaterogénicas LDL y VLDL, la generación de partículas HDL pequeñas y densas con bajo contenido en colesterol (40).

La dislipidemia aterogénica se considera uno de los factores de riesgo cardiovascular más significativos en la población diabética. De hecho, se ha observado que en niveles equivalentes de colesterol LDL (incluso dentro de los límites recomendados), los pacientes con DM2 que presentan una proporción mayor de partículas de LDL pequeñas y compactas tienen un mayor riesgo cardiovascular (41). Los triglicéridos en sí mismos no contribuyen a la formación de la placa de ateroma, pero se ha demostrado que las lipoproteínas ricas en triglicéridos desempeñan un papel causal en el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (42). El colesterol HDL se encarga del transporte inverso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado, facilitando la eliminación de colesterol de las paredes arteriales, y es por esta razón que existe una correlación inversa con el riesgo cardiovascular. Por todo ello, además de cambios en el estilo de vida como cambios en la dieta, abandono de malos hábitos y aumento de la actividad física, en la población con DM2 se suele prescribir el tratamiento con agentes hipolipemiantes como las estatinas o los fenofibratos (37).

1.3.4 Hipertensión arterial

Se define hipertensión como el trastorno causado por la anormal elevación de los niveles de presión sanguínea. En lo que se refiere a la población con DM2, se sabe que la incidencia de hipertensión es el doble que en la población no diabética. De hecho, cerca del 30 % de los pacientes con DM2 recién diagnosticada presentan cifras elevadas de presión arterial. Además, la población hipertensa tiene más probabilidad de desarrollar DM2 que los individuos normotensos (43). En lo que respecta a los objetivos de presión arterial en individuos con DM2, en el estudio ACCORD (44) se señaló que reducir los niveles de presión arterial sistólica por debajo de 120mmHg no suponía ningún beneficio cuando se comparó con reducir los niveles

por debajo de 140 mmHg. Todo ello pese a observar una reducción del 41 % en el riesgo de infarto (pasando del 0,53 % en el grupo con objetivo <140 mmHg a 0,32 % en el grupo <120 mmHg). Sin embargo, en el grupo con intensiva terapia antihipertensiva se observaron varios efectos adversos, incluyendo fallo renal, cuya probabilidad de desarrollo fue mayor en este grupo (44). Así, actualmente las cifras objetivo de presión arterial para diabéticos son entre 130-139/80-85 mmHg según la Sociedad Europea de Hipertensión.

La hipertensión juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedad cardiovascular que se considera la mayor causa de morbilidad y mortalidad en la DM2. Por ello, la DM2 y la hipertensión están estrechamente relacionadas y comparten numerosos factores de riesgo como disfunción endotelial, inflamación vascular, aterosclerosis, hiperlipidemia y obesidad. Su frecuente coexistencia también se explica debido a puntos comunes en su fisiopatología, especialmente en lo que se refiere a resistencia a la insulina y a la obesidad. Por ejemplo, en el *San Antonio Heart Study* el 85 % de los individuos con DM2 desarrollaron hipertensión a la edad de 50 años mientras que en el 50 % de los individuos con hipertensión a la misma edad se observó una disminución en la tolerancia a la glucosa (45). Finalmente, hay que destacar que existe una superposición sustancial en las complicaciones cardiovasculares de la diabetes y la hipertensión relacionadas principalmente con enfermedades microvasculares y macrovasculares. Este hecho, se debe fundamentalmente a diferentes alteraciones, como la elevación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento del estrés oxidativo e inflamación y una inadecuada activación del sistema inmune (43,46).

1.4 DM2 y riesgo cardiovascular

Es bien conocido que los pacientes con DM2 presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares, en concreto, se ha observado que alrededor de un 32 % de la población diabética presenta algún tipo de afección cardiovascular. La mayoría de estas afecciones tienen un origen inflamatorio que involucra la disfunción del endotelio vascular y el proceso aterosclerótico. De hecho, la prevalencia de aterosclerosis en la DM2 es del 29.1 % (47).

1.4.1 Inflamación

Una de las características más importantes de la DM2 como enfermedad crónica es la existencia de un estado inflamatorio general de bajo grado. Algunos autores han llegado a definir la DM2 como enfermedad inflamatoria debido a la estrecha relación entre ambas (48). Este hecho se ve reflejado en los elevados niveles de marcadores de inflamación y moléculas

proinflamatorias presentes en la población diabética. Por otro lado, la existencia de niveles elevados de proteína C reactiva (PCR), interleuquina 1 β (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL-6) se consideran marcadores predictivos para el desarrollo de DM2 (49).

En la DM2, dos de los principales responsables de los elevados niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes son el hígado y el tejido adiposo, debido principalmente a su alta capacidad metabólica. Una de las principales citoquinas proinflamatorias es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que es liberado fundamentalmente por los macrófagos reclutados en el tejido adiposo, principalmente en un contexto de expansión e hipertrofia excesiva mantenida en el tiempo (50). El TNF- α junto con otras citoquinas y sumado al exceso de ácidos grasos saturados, activan las rutas de señalización de la proteína quinasa C (PKC), la quinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK) y la quinasa de I κ B (IKK) que conduce a la activación de NF- κ B (51). La activación de estas rutas termina conduciendo a la fosforilación de los IRS en sus residuos serina, en lugar de tirosina, lo que disminuye su afinidad por el IR, disminuyendo así la transducción de la señal de la ruta de la insulina y contribuyendo por tanto a la resistencia a la insulina (52). La hipoxia es otro de los mecanismos inflamatorios asociados a la DM2, encontrado principalmente en el tejido adiposo hipertrofiado. Cuando este tejido crece por encima de su capacidad natural, se generan regiones hipóxicas donde se acumularán macrófagos que, a su vez, liberarán moléculas proinflamatorias y proangiogénicas (53) que contribuirán al estado general inflamatorio.

También relevante es la inflamación mediada por IL-1 β , inducida por la hiperglucemia y los AGL (54,55). En este sentido, se ha observado que el tratamiento de adipocitos humanos con esta citoquina, es capaz de disminuir la expresión de IRS-1 lo que a su vez supone la reducción en la traslocación y expresión del receptor de glucosa dependiente de insulina GLUT-4 (56). Además, también se ha visto que en la célula beta pancreática, bajo condiciones de hiperglucemia, se produce un aumento en los niveles de IL-1 β , promoviendo el deterioro de la masa de células beta pancreáticas debido a la inducción de la apoptosis mediada por el receptor FAS (54).

Ruta de NF- κ B

El factor nuclear NF- κ B es un heterodímero con funciones de regulación transcripcional. En su estado inactivo se encuentra en el citosol unido a la proteína inhibitoria I κ B. Diversos estímulos procedentes del exterior celular, como las especies reactivas del oxígeno (ERO), lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o ciertas citoquinas, pueden provocar la activación de NF- κ B (57). La activación de NF- κ B se inicia a través de la degradación de las proteínas I κ B y esto ocurre principalmente mediante la activación de la quinasa IKK que fosforila dos residuos serina

localizados en el dominio regulador de la proteína inhibidora I κ B. Esta fosforilación desencadena la ubiquitinación y posterior degradación de I κ B en el proteasoma, quedando libre NF- κ B que entrará al núcleo y mediará la transcripción de genes específicos (58). El estrés metabólico que favorece la resistencia a la insulina y la aparición de DM2 también activa la quinasa IKK, lo que sugiere que esta quinasa también juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades metabólicas.

En condiciones de hiperglucemia, la actividad de NF- κ B se encuentra significativamente aumentada lo que supone la liberación de una cantidad anormal de citoquinas (TNF- α , IL1- β , IL-6 Y MCP-1 entre otras) (59) que provocan la apoptosis de las células endoteliales y la generación de un estado proinflamatorio. La activación excesiva de NF- κ B también provoca una alteración en los niveles de expresión de diversos factores de crecimiento y proteínas endoteliales, lo que termina provocando daño vascular (60).

1.4.2 Disfunción endotelial

En condiciones de homeostasis, las células endoteliales mantienen el flujo sanguíneo y su fluidez, controlan la permeabilidad vascular y regulan el estado de activación de los leucocitos (61). Un endotelio en reposo no interacciona con células inmunes debido a la falta de expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) así como la molécula de adhesión de célula vascular 1 (VCAM-1) y también debido a que los cuerpos Weibel-Palade (WPB) permanecen almacenados. Paralelamente, el endotelio regula el flujo y perfusión tisular mediante modificaciones en el tono y diámetro vascular. Esto se consigue mediante la producción y secreción de moléculas con capacidad vasodilatadora (prostaciclina y el óxido nítrico (NO)) y vasoconstrictora (angiotensina II y endotelina 1). En este sentido, la represión transcripcional de NF- κ B mediada por NO parece ser la responsable del mantenimiento del estado de reposo, siendo capaz de inhibir la expresión de quimioquinas, citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión leucocitarias (62,63).

Bajo las condiciones de hiperglucemia, resistencia a la insulina e inflamación características de la DM2 se produce un desequilibrio en la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores, alterándose la actividad del endotelio. A este estado se le conoce como disfunción endotelial (64). Cuando el endotelio se encuentra en este estado, se observa una mayor predisposición a favorecer la inflamación, activación plaquetaria, infiltración leucocitaria, estrés oxidativo, vasoconstricción, alteración de la coagulación y, en última instancia, aterosclerosis y trombosis (65). Así, la hiperglucemia es considerada como uno de los principales factores en el desarrollo de la disfunción endotelial en pacientes con DM2, ya que

genera daño vascular al desencadenar un desequilibrio en la biodisponibilidad del NO a favor de la acumulación de ERO (66). Esto es debido a la reacción del NO con el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) para formar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), molécula altamente reactiva, aumentando de esta manera el estrés oxidativo a la par que reduce la biodisponibilidad del NO (67). Además, la insulina, a través de la ruta de señalización dependiente de PI3K regula la producción de NO, por lo que en un contexto de resistencia a la insulina donde esta ruta se ve alterada, se va a comprometer la suficiente producción de NO, contribuyendo por tanto a la aparición de disfunción endotelial (68) y alteraciones en la vasodilatación.

1.4.3 Interacción Leucocito-endotelio

Especialmente relevante es el papel que desempeñan los leucocitos en la DM2. No solo están relacionados con gran variedad de los complejos procesos moleculares asociados a la fisiopatología de la DM2, sino que su activación y función alterada se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad (69). Los leucocitos son células con elevada permeabilidad a la glucosa, así como con un alto metabolismo glucídico. Por ello, en un contexto de hiperglucemia mantenida en el tiempo, se van a desencadenar una serie de procesos patológicos, tales como una elevada producción de ERO, excesiva producción de citoquinas proinflamatorias y aumento de las interacciones con el endotelio entre otras. Igualmente, también se ha relacionado una inadecuada activación del sistema inmune con la aparición de resistencia a la insulina. Uno de los mecanismos estudiados para ello es el que involucra $IKK\beta$ cuyo aumento de expresión en leucocitos favorece la activación de la cascada inflamatoria y, como se ha comentado anteriormente, promueve la resistencia a la insulina mediante la fosforilación de los IRS en sus residuos serina (70,71).

Otra de las consecuencias del estado inflamatorio de bajo grado observado en la DM2 es la alteración de las interacciones de los leucocitos con el endotelio. La existencia de estímulos inflamatorios produce la liberación de quimioquinas y citoquinas por parte de las células endoteliales, que favorecen el acercamiento de los leucocitos a la pared vascular (72). Paralelamente, estas moléculas proinflamatorias estimulan la producción de moléculas de adhesión en la superficie endotelial, permitiendo la unión a los leucocitos circulantes. En este punto, las proteínas mediadoras del primer contacto entre los leucocitos y el endotelio son las selectinas. En concreto, la E-selectina (presente en las células endoteliales activas) y la L-selectina (expresada constitutivamente en leucocitos) (73). Tras este primer contacto, la unión entre el leucocito y el endotelio no es lo suficientemente firme para mantenerlos unidos. Por ello, el leucocito va a “rodar” sobre el endotelio, en un proceso mediado por la P-selectina

(expresada en la superficie endotelial). Así, los leucocitos van disminuyendo su velocidad a medida que interactúan con el endotelio hasta que se adhieren firmemente a él, debido a la unión de las integrinas (superficie leucocitaria) con receptores tipo inmunoglobulina ubicados en la superficie endotelial (ICAM y VCAM) (74). Finalmente, estas, junto con otras proteínas implicadas como la molécula de adhesión plaqueta-endotelial (PECAM-1) median el proceso de diapédesis o extravasación leucocitaria a través de los espacios intercelulares en el endotelio (75).

Existen varias formas de evaluar las interacciones leucocito endotelio. Una de las más comunes consiste en la medición de las moléculas de adhesión celular (CAM) en plasma o suero. Esto es posible ya que tras la activación de las células endoteliales, las CAM (en concreto la E-selectina junto con ICAM-1) pueden sufrir proteólisis liberando una parte soluble de la proteína sobre la cual se basa la medición (76). Existen diversos estudios que señalan una mayor presencia de estas CAM solubles en pacientes con DM2, lo que a su vez refleja una mayor activación endotelial con el consiguiente aumento de las interacciones leucocito-endotelio. Este hecho representa un aumento en el riesgo de sufrir complicaciones vasculares, así como el desarrollo temprano de aterosclerosis (77). Por otro lado, también existen métodos que permiten evaluar las interacciones entre los leucocitos y el endotelio a nivel celular tanto *in vivo* mediante el uso de animales de experimentación donde se pueden obtener imágenes intravitales (78) como *ex vivo* que consisten en el aislamiento y uso de leucocitos y células endoteliales para recrear lo más fielmente posible las interacciones entre ambos (79). De igual forma, y utilizando esta metodología, diversos estudios han señalado el considerable aumento de las interacciones leucocito-endotelio en la DM2, así como sus implicaciones cardiometabólicas, (79–81).

Por tanto, dada la especial relevancia de las interacciones de los leucocitos con el endotelio en el proceso aterosclerótico y en el desarrollo de complicaciones vasculares, el estudio de las moléculas y los mecanismos implicados permitirá conocer con más detalle el papel que desempeñan en la DM2 y otras enfermedades metabólicas.

1.4.4 Aterosclerosis

Una de las complicaciones cardiovasculares más comunes en la DM2 es el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Figura 3). Estas se producen en un entorno proinflamatorio que, como se ha comentado anteriormente, suele venir acompañado de hiperlipidemia y disfunción endotelial. La aterosclerosis consiste en la formación de placas de ateroma en la vasculatura, en gran parte generadas por la encapsulación de lípidos, colesterol, calcio y células apoptóticas en

la túnica media vascular. El proceso comienza con la acumulación de LDL en el espacio subendotelial, donde son oxidadas por ERO o por enzimas como las lipooxigenasas y mieloperoxidasas liberadas por células del sistema inmune. Hay que destacar que los pacientes con DM2 sufren cambios considerables en las partículas LDL, presentando moléculas de LDL más pequeñas y densas que tienen una mayor facilidad para atravesar la pared endotelial y ser oxidadas, favoreciendo el proceso aterosclerótico (82). Así, las LDL oxidadas van a promover la activación de las células endoteliales, aumentando su permeabilidad y favoreciendo la liberación de citoquinas, quimioquinas y moléculas proinflamatorias (83). En este punto se produce el reclutamiento de células inmunes, siendo los monocitos los primeros en llegar al lugar de activación y migrar al espacio subendotelial donde, a través de sus receptores tipo *scavenger*, reconocerá las LDL oxidadas (84). Este reconocimiento tiene como consecuencia la diferenciación del monocito en macrófago, tras lo cual se producirá la endocitosis y acumulación en el citoplasma de las partículas de LDL oxidadas, transformando los macrófagos en células espumosas (85). La existencia de elevadas concentraciones de LDL en el espacio subendotelial puede hacer sobrepasar la capacidad de acumulación de los macrófagos, promoviendo la apoptosis de las células espumosas que terminarán liberando todo su contenido a la pared vascular. Este proceso estimula la respuesta inmune, atrayendo más leucocitos al lugar y sentando las bases para la formación de la placa de ateroma (86).

A medida que progresa la lesión aterosclerótica, se potencia el estado proinflamatorio y se favorece la proliferación celular del músculo liso. En esta etapa final, se liberan factores de crecimiento secretados por células endoteliales y células musculares lisas, como el factor de crecimiento de fibroblastos, lo que favorece la formación de una capa fibrosa formada por proteoglucanos y colágeno entre otros, aumentando la lesión. De este modo, la placa de ateroma puede provocar la oclusión del vaso donde se ubica o, en caso de rotura, a la oclusión de vasos distantes mediante la formación de trombos (87).

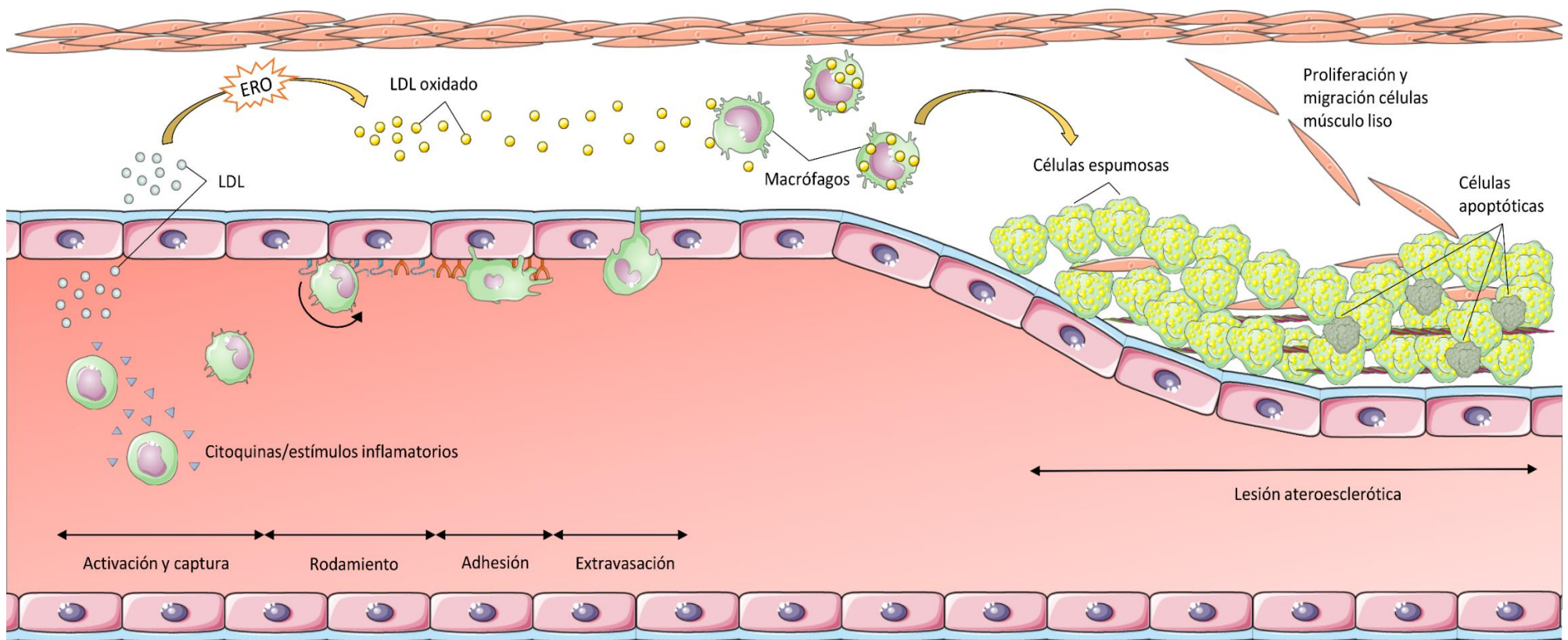


Figura 3. Proceso de formación y patogénesis de la aterosclerosis. En un contexto de disfunción endotelial e hiperlipidemia, las LDL se acumulan en el espacio subendotelial de la vasculatura, donde son oxidadas por las ERO. A su vez, las células endoteliales liberan citoquinas y quimioquinas, que activan y atraen a los leucocitos. Estos, se unen al endotelio y tras un proceso de rodamiento y adhesión firme, se produce su extravasación al lugar de la lesión. Los monocitos reclutados son los primeros en diferenciarse a macrófagos fagocitando las LDL oxidadas convirtiéndose en células espumosas. Estas se acumulan en la túnica media vascular hasta que su capacidad de almacenamiento se ve sobrepasada, sufriendo apoptosis y liberando todo su contenido, lo que potencia todavía más la reacción inflamatoria. En etapas posteriores de la formación de la placa de ateroma, aparecen componentes fibróticos como el colágeno o los proteoglucanos que favorecen la aparición de una lesión avanzada y la oclusión de la pared vascular.

1.5 Mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología de la DM2

1.5.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es consecuencia de una alteración en el equilibrio entre la producción de moléculas con potencial oxidante y la disponibilidad de los compuestos destinados a contrarrestar su efecto (defensas antioxidantes). Cuando esto sucede, se altera el estado redox de la célula, desencadenando numerosos procesos patológicos asociados a enfermedades metabólicas como la DM2.

Los radicales libres aparecen en varias formas, según la naturaleza del átomo reactivo en cuestión. Así, podemos encontrar especies reactivas del nitrógeno o del azufre, aunque, sin duda, las más importantes son las ya mencionadas ERO. La producción de ERO puede ser resultado de la oxidación de moléculas de agua (H_2O) o la reducción de oxígeno molecular (O_2) dando como resultado peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Entre ellos, el H_2O_2 , aunque técnicamente no es un radical libre, es considerado una de las moléculas oxidantes más importantes debido a su papel en la regulación de importantes procesos biológicos (88). Así, en condiciones homeostáticas, las concentraciones de esta molécula son controladas de forma estricta en la célula, mantenidas en el rango nanomolar (aproximadamente entre 10^{-7} y 10^{-9} M). Su producción se ve estimulada por señales metabólicas o por algunos agentes estresantes como factores de crecimiento o quimioquinas, mientras que su eliminación está mediada por agentes antioxidantes (88). Por otro lado, la concentración celular del $\text{O}_2^{\cdot-}$ es considerablemente menor, manteniéndose alrededor de 10^{-11} M. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es una molécula muy reactiva, por lo que es rápidamente convertida a H_2O_2 por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) siendo así la mayor fuente de H_2O_2 en la célula (89). Por último, en lo que respecta al $\cdot\text{OH}$, su formación está mediada por iones metálicos de cobre o hierro, que reducen el H_2O_2 para formar $\cdot\text{OH}$ (89).

Mitocondria como fuente de ERO

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana cuya función principal es la producción de energía (90). La matriz mitocondrial es el lugar donde se realiza el ciclo de Krebs, la beta oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) mediante fosforilación oxidativa. Este último es el proceso por el cual electrones, transferidos por la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y por el flavín adenín dinucleótido (FADH_2), son transportados a través de cinco complejos proteicos - en su conjunto denominados cadena de transporte de electrones o ETC - para la síntesis de ATP. Esta síntesis es dependiente del buen

funcionamiento de la ETC y del mantenimiento de un gradiente electroquímico de protones que sirva de fuerza motriz (91).

El complejo I o NADH deshidrogenasa, es un complejo formado por 45 subunidades que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hacia el complejo III a través de la coenzima Q (CoQ). Esta transferencia permite que, a través de la función de bomba de protones existente en uno de los dominios del complejo I, se transporte un protón al espacio intermembrana mitocondrial (IMS) por cada dos electrones transferidos (92). El complejo II también llamado succinato deshidrogenasa es parte del ciclo de Krebs y cataliza la transferencia de electrones desde el succinato a la CoQ a través de FADH_2 y agregados hierro-azufre (FeS), en este caso sin bombeo de protones al IMS (93). El complejo III también llamado CoQ-citocromo C oxidorreductasa es una proteína transmembrana con múltiples subunidades y con función de bomba de protones. En el complejo III se transfieren los electrones cedidos por los complejos I y II a la coenzima Q hacia el citocromo C, en un mecanismo denominado ciclo Q (94). En este proceso se contribuye también al gradiente electroquímico, transportando protones al IMS. El cuarto componente de la cadena de electrones, complejo IV o citocromo C oxidasa cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo C al oxígeno molecular (O_2) generando agua en el proceso (95) y contribuyendo nuevamente al gradiente de protones. El último componente de la cadena de electrones es el complejo V o ATP sintasa que utiliza el gradiente de protones creado por los complejos I, III y IV para la síntesis de ATP. Esta enzima consta de dos complejos principales, F_0 que atraviesa la membrana interna mitocondrial y F_1 ubicado en la matriz mitocondrial. El componente F_0 canaliza el paso de los protones desde el IMS hacia la matriz mitocondrial, causando cambios conformacionales en la enzima que exponen los centros catalíticos del componente F_0 , produciéndose la fosforilación de adenosín difosfato (ADP) a ATP (96).

Una parte de los electrones cedidos a la ETC no completa el recorrido hasta el complejo IV, sino que son directamente transferidos al O_2 generando $\text{O}_2^{\cdot-}$. Así, hasta el 2 % del oxígeno molecular es consumido en las células sin generar ATP. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es generado principalmente en los complejos I y III y es rápidamente convertido a H_2O_2 por la SOD (97). Cuando el funcionamiento de la ETC se ve alterado, la cantidad de ERO producido aumenta en gran medida. En condiciones de hiperglucemia, la sobrecarga de glucosa hace aumentar el metabolismo celular en un intento de hacer frente a la elevada disponibilidad de nutrientes. Cuando la relación ATP/ADP es muy elevada, debido a la falta de demanda energética que suele ocurrir en enfermedades como la DM2 o la obesidad, se detiene la producción de ATP en el complejo V. Como consecuencia, en la mitocondria se observa un elevado gradiente de protones, así como grandes cantidades de

CoQ reducida que favorece el transporte reverso de electrones. Estos, por tanto, no tendrán como aceptor final al oxígeno para formar agua en el complejo IV, sino que permanecerán en los transportadores o los complejos mitocondriales pudiendo reaccionar y dañar diversas moléculas, así como generar ERO (98). Cabe también mencionar que la ETC no es la única fuente de ERO en la mitocondria ya que también pueden ser producidos por enzimas que participan en diversos procesos metabólicos, como la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs.

Defensas antioxidantes

Los compuestos con actividad antioxidante son aquellos que eliminan o previenen la formación excesiva de radicales libres, manteniendo sus niveles en rango fisiológico (99). Dada la importancia del papel que desempeñan en la célula, es necesario que puedan actuar en compartimentos celulares hidrofílicos e hidrofóbicos, por lo que su estructura molecular es diversa. En lo referente a la naturaleza de su función se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos

Existen diversos enzimas que previenen la acumulación de radicales libres actuando directamente sobre las ERO (enzimas primarios) y enzimas que tienen una participación indirecta ya que actúan asistiendo a otros antioxidantes (enzimas secundarios). Los enzimas primarios tienen como sustrato los productos de reducciones incompletas del oxígeno, principalmente el anión $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 , mientras que los enzimas secundarios son los encargados de reponer los componentes necesarios, por ejemplo, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y glutatión (GSH) (100,101).

Los principales enzimas primarios son la SOD, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). La SOD es una metaloproteína que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a oxígeno molecular y a H_2O_2 que es subsecuentemente dismutado por la CAT. Como ya se ha mencionado, el $O_2^{\cdot -}$ puede interaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito y agravar el estrés oxidativo a la par que reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico, esencial en el control de la relajación vascular. Por ello, la SOD juega un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ en rango fisiológico (102). Existen tres tipos de SOD: SOD1, presente en la mayoría de los compartimentos citosólicos y en el espacio intermembrana mitocondrial; SOD2, sintetizada en el citosol, pero más tarde ubicada en la matriz mitocondrial; y SOD3 forma soluble secretada que puede ser encontrada en el plasma. SOD se expresa en vasos sanguíneos, pulmones, riñón, útero y corazón (103). La CAT es un enzima perteneciente a la familia de oxidorreductasas, dependiente del manganeso y el grupo hemo como cofactores. Se encuentra

principalmente en los peroxisomas y, a pesar de estar presentes en numerosos tejidos, su mayor actividad se detecta en el hígado y en los eritrocitos. Cataliza la dismutación de H_2O_2 a H_2O y O_2 disminuyendo así el daño causado por un exceso de H_2O_2 en la célula (104). La GPX también pertenece a las familias de las oxidorreductasas, en este caso la enzima depende del Selenio como cofactor. Cataliza la descomposición del H_2O_2 en O_2 y H_2O utilizando como donante de electrones dos moléculas de glutatión.

Todas las enzimas anteriormente descritas dependen de la generación continua de compuestos con actividad antioxidante en su forma reducida como, por ejemplo, el glutatión o las tioredoxinas. Esto se consigue generalmente mediante la acción de reductasas dependientes de NADPH como la glutatión reductasa o la tioredoxina reductasa que se consideran enzimas secundarias. Por lo tanto, las enzimas responsables de la producción continua de NADPH podrían ser consideradas enzimas secundarias, puesto que su pérdida de función puede suponer la alteración del balance de ERO (101).

Antioxidantes no enzimáticos

Existen diferentes compuestos de bajo peso molecular pueden actuar como antioxidantes. En este caso, su acción no es catalítica, requieren de la regeneración de su capacidad antioxidante o su reposición mediante la dieta (100).

Tanto el glutatión como la tioredoxina pueden actuar como neutralizadores de ERO sin necesidad de actividad enzimática. El glutatión (glutamato-cisteína-glicina) es un tripéptido principalmente localizado en el citosol, pero también en el núcleo, en los peroxisomas y en la mitocondria. Pese a esta elevada distribución, el hígado es el principal lugar de síntesis de este compuesto. Su actividad antioxidante se basa en el grupo tiol del aminoácido cisteína presente en su estructura. En presencia de compuestos oxidantes como las ERO, el grupo tiol tiene la capacidad de dimerizar con el grupo tiol de otra molécula de glutatión, formando un puente disulfuro y donando sus electrones para la neutralización del ERO. Otro compuesto con actividad antioxidante es la coenzima Q10 o ubiquinona, isoprenoide ubicado en las membranas celulares fundamental para el correcto funcionamiento de ETC en la mitocondria. Se trata de uno de los pocos antioxidantes liposolubles, por lo que cumple la importante función de proteger lípidos y lipoproteínas frente al daño producido por los compuestos oxidantes. Otros ejemplos de antioxidantes no enzimáticos serían el ácido lipoico o la melatonina. Finalmente, mención especial requieren ciertos compuestos cuyas rutas de síntesis solo se encuentran en microorganismos y células vegetales por lo que su aporte debe ser satisfecho regularmente por

la dieta. Dentro de esta categoría podemos encontrar las vitaminas C y E, así como carotenoides y polifenoles (100,101).

Estrés oxidativo en la DM2

En el desarrollo de la DM2, así como en su patogénesis y complicaciones asociadas el estrés oxidativo juega un papel fundamental, siendo considerado uno de los principales responsables de estos procesos. Se ha demostrado que los pacientes con DM2 producen una mayor cantidad de ERO que los sujetos sanos, además de presentar elevados niveles de daño tisular relacionado con estrés oxidativo y menores defensas antioxidantes (80,105). El principal factor responsable del estrés oxidativo en los pacientes con DM2 es la hiperglucemia. El aumento de los niveles de glucosa incrementa la producción de ERO en la ETC lo que, a su vez, acaba comprometiendo el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs, acumulándose intermediarios como el gliceraldehído 3-fosfato (106). En este punto, se produce la formación de productos avanzados de glicosilación (AGEs) y se ponen en marcha rutas para metabolizar estos intermediarios, como la ruta del polialcohol o la ruta de la hexosamina. Como resultado final, se exagera la producción de ERO y se genera estrés oxidativo (107,108).

Las células beta pancreáticas son especialmente sensibles a la acumulación de ERO debido a su reducida producción de defensas antioxidantes. Las ERO mitocondriales pueden dañar el ADN mitocondrial con el consiguiente impacto sobre la eficiencia respiratoria. Este hecho provoca que se deba depender en mayor medida de la glucólisis para la producción de ATP, mucho menos eficiente que la fosforilación oxidativa. Como consecuencia, se produce una reducción de la cantidad disponible de ATP que merma la función de los canales iónicos dependientes de ATP necesarios para la liberación de insulina (109). Otro de los mecanismos por los cuales las ERO mitocondriales afectan la función de la célula beta, es mediante la disminución irreversible de los factores de transcripción PDX-1 y MAFA vitales para la secreción de insulina y para la identidad de la célula beta (110,111). Además, la presencia de elevadas concentraciones de ERO también activan a IKK lo que disminuye la señalización de la ruta de la insulina por fosforilación de los IRS en sus residuos serina (112). Finalmente, las ERO pueden inducir la activación de la ruta apoptótica mediada por JNK, causando así la disminución de la masa de células beta (113).

En el hígado, el estrés oxidativo y la acumulación de AGEs provocan alteraciones en la mitocondria con la consiguiente pérdida de equilibrio redox, disminución de la fosforilación oxidativa y cambios en el estado metabólico. Como consecuencia, se produce la acumulación de lípidos en la célula que provocan que el hígado sea más propenso a desarrollar enfermedad de

ácido graso no alcohólico (NAFLD) o esteatosis hepática no alcohólica (NAFL)(114). En las células musculares, el estrés oxidativo producido por la hiperglucemia y el exceso de AGL induce la fosforilación de los IRS en sus residuos serina y su degradación. Como consecuencia se silencia la ruta de señalización de la insulina que, en última instancia, desemboca en la resistencia a la insulina. En cuanto a los adipocitos, se ha visto que la acumulación de ERO contribuye a la aparición de resistencia a la insulina por vías similares a las observadas en las células musculares. Las principales fuentes de ERO en el adipocito son la NADPH oxidasa 4 (NOX4), la ruta del polialcohol y la mitocondria (115). Además, el entorno proinflamatorio provocado por el estado de hiperglucemia e hiperlipidemia promueve el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo, que también producirán ERO a través de la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2) acrecentando así el estrés oxidativo (116). Esta gran acumulación de ERO tiene como consecuencia la producción de citoquinas quimiotácticas que reclutan más macrófagos, promoviendo inflamación (117) y la hipertrofia del tejido adiposo (118). En cuanto a los leucocitos, se ha sugerido que en la DM2 son más propensos a generar ROS, lo que hace que su supervivencia sea menor que los leucocitos de sujetos sanos y tengan mayor tendencia a la apoptosis (119). Además, se han encontrado niveles elevados de peroxinitrito, H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ en diferentes poblaciones de leucocitos de pacientes con DM2 (120).

1.5.2 Disfunción mitocondrial

Se define disfunción mitocondrial como el estado en el cual la mitocondria no es capaz de satisfacer las necesidades celulares de ATP (121). La disfunción mitocondrial suele venir acompañada por una alteración en el número, densidad o estructura de las mitocondrias que afecta a la cadena de transporte de electrones. Existen factores genéticos que pueden conducir al estado de disfunción mitocondrial como, por ejemplo, alteraciones en genes que codifican proteínas relacionadas en la fosforilación oxidativa o en genes codificantes de proteínas estructurales mitocondriales (122). Por otro lado, también existen factores ambientales que producen estrés oxidativo y terminan dañando la mitocondria (122).

Las mitocondrias son las principales productoras de ERO en la célula, por ello, también son los orgánulos más afectados por el daño oxidativo. El ADN mitocondrial es especialmente sensible al daño producido por las ERO ya que, a diferencia del ADN nuclear, no se encuentra asociado a histonas (123). El ADN mitocondrial codifica diversas proteínas necesarias para el proceso de fosforilación oxidativa, por lo que su alteración implica el incorrecto funcionamiento de la ETC. Esto a su vez, genera una mayor producción y liberación de ERO iniciándose una cascada de procesos que pueden acabar en la inducción de apoptosis (124). De igual forma, las

ERO generadas en el proceso de fosforilación oxidativa dañan las proteínas mitocondriales, afectando a su afinidad por los sustratos y coenzimas (125). Estos eventos son de especial importancia para el complejo I de la ETC, pues es uno de los principales puntos de generación de ERO en la mitocondria y, por tanto, uno de los más susceptibles a sufrir daño oxidativo. Además, en términos relativos, la membrana interna mitocondrial presenta una menor cantidad de complejo I que del resto de complejos de la ETC, por lo que su alteración o deterioro es de especial relevancia para la función mitocondrial (126,127). Los niveles elevados de ERO también puede dañar algunos fosfolípidos de la membrana mitocondrial como la cardiolipina. La cardiolipina alterada permite el paso de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, produciéndose así una pérdida parcial del potencial de membrana (128).

La disfunción mitocondrial es detectada cuando existen niveles anormales de consumo de oxígeno, así como cambios en el potencial de membrana. También se observa una producción excesiva de ERO, baja producción de ATP y fuga de protones del IMS a la matriz lo que fuerza a la célula a depender de la glicólisis para la generación de ATP en lugar de la fosforilación oxidativa. En estas circunstancias, la mitocondria puede alterar su forma, aumentando o disminuyendo su tamaño en un intento de satisfacer las demandas celulares de energía y metabolitos (129). De esta forma, las mitocondrias pueden redistribuirse mediante ciclos de fusión y fisión, eliminarse mediante una forma específica de autofagia denominada mitofagia y reponerse mediante la generación de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial) (121).

Disfunción mitocondrial en la DM2

La disfunción mitocondrial también está asociada a la resistencia a la insulina observada en la DM2. Este proceso comienza cuando la sobrecarga de nutrientes presente en la diabetes se traslada en un desequilibrio en el ratio NADH/NAD^+ y este, a su vez, en un aumento de la producción de ERO mitocondriales. Así, la sobrecarga de los sistemas antioxidantes y la inhibición de los mecanismos de reparación mitocondrial terminan por producir mitocondrias disfuncionales, que no podrán aportar el ATP y los cofactores necesarios para la liberación de insulina (130). Por otro lado, esta alteración en la actividad mitocondrial también afecta a la traslocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana celular, así como a la absorción de calcio contribuyendo así a la resistencia a la insulina (131). Finalmente, el aumento del ratio NADH/NAD^+ provoca un descenso en el proceso de oxidación de los ácidos grasos, y por tanto, la acumulación de intermediarios lipídicos como el diacilglicerol o el acetil-CoA. Todo ello, sumado a las condiciones de estrés oxidativo, producirá una activación de las quinasas

serina/treonina sensibles al estrés, que terminarán fosforilando a las proteínas IRS e inhibiendo así la ruta de señalización de la insulina (132).

Los hepatocitos de pacientes con DM2 también muestran señales de disfunción mitocondrial, elevada producción de ERO mitocondriales y alteraciones en los complejos que forman la ETC lo que, en última instancia, promueven la resistencia a la insulina mediante la activación de la ruta JNK y fosforilación en los residuos serina de la proteína IRS2 (133). En las células musculares, las ERO producidas por la mitocondria desencadenan la acumulación excesiva de lípidos y promueven la resistencia a la insulina (134). Además, todas estas alteraciones a nivel mitocondrial provocan la acumulación de ceramida y carnitina en el músculo esquelético, debido a la ralentización de la beta oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs, así como a la despolarización de la membrana mitocondrial aumentando nuevamente la resistencia a la insulina (135). Es de destacar, que el tejido adiposo también es sensible a las alteraciones sufridas en la mitocondria, ya que se ha visto que la inhibición del factor de transcripción mitocondrial A (mTFA) causa disfunción mitocondrial y contribuye a la resistencia a la insulina (136). Por último, en lo que respecta a los leucocitos, también se han observado alteraciones en la mitocondria. Los leucocitos de pacientes con DM2 muestran un aumento en la producción de ERO mitocondriales debido a la disfunción del complejo I de la ETC además de un notable descenso en las defensas antioxidantes (80).

1.5.3 Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado evolutivamente y común a todas las especies eucariotas. La autofagia es uno de los principales mecanismos regulatorios de la homeostasis corporal y está implicada tanto en procesos metabólicos básicos como en procesos más complejos como el envejecimiento, cáncer, DM2 y otros desórdenes metabólicos (137). Durante el proceso autofágico se descomponen proteínas y péptidos ayudando a la adaptación de la célula a diferentes situaciones de estrés, mediante la aportación de una reserva de aminoácidos. Además, la autofagia regula las condiciones intracelulares a su nivel más fundamental a través del recambio citoplasmático de proteínas y orgánulos. Recientemente, se ha definido el concepto de autofagia selectiva, habiéndose demostrado que la maquinaria autofágica es capaz de detectar sustratos específicos, como mitocondrias, gotas de lípidos y peroxisomas entre otros, lo que provoca su descomposición y reciclaje. También se ha demostrado que la autofagia desempeña un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa, por ejemplo, facilitando la unión de antígenos endógenos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad-II (MHC-II) (137).

Existen tres tipos principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia (en adelante autofagia) consiste en el confinamiento del contenido citoplasmático en una doble membrana denominada autofagosoma, seguido de la fusión con un lisosoma donde el contenido será digerido gracias a las enzimas lisosomales. La microautofagia consiste en la absorción directa de la carga citoplasmática en el lisosoma, sin la formación de autofagosoma. Finalmente, en la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas son guiadas selectivamente a los lisosomas gracias a determinados péptidos y asistidas por chaperonas en su unión a los lisosomas.

El proceso autofágico

El proceso autofágico está mediado por múltiples proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) y puede dividirse en, al menos, cinco pasos secuenciales: (1) iniciación, (2) nucleación de la doble membrana y formación de un preautofagosoma o fagóforo, (3) elongación del fagóforo y secuestro de la carga citoplasmática, (4) fusión del autofagosoma (el fagóforo completamente encerrado) con el lisosoma, y (5) degradación de la carga secuestrada en el autolisosoma (138).

El primer paso en la formación del autofagosoma consiste en el ensamblaje del complejo Quinasa 1 Activadora de la Autofagia Tipo Unc-51 (ULK), formado por las proteínas ATG13, FIP200, ATG 101 y ULK1 (139). Entre los principales reguladores de este proceso se encuentran mTOR y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Estas proteínas son sensibles al balance energético y actúan inhibiendo o activando el flujo autofágico. mTOR inhibe la autofagia mediante la fosforilación de ATG13 y ULK1 mientras que AMPK actúa inhibiendo mTOR y activando ULK1 y Beclina1 (140,141). Otra familia esencial de proteínas de la autofagia está formada por las proteínas de cadena ligera 3 asociadas a microtúbulos (LC3) y las proteínas asociadas a receptores de ácido gamma-aminobutírico (GABARAP). Las proteínas de la familia LC3/GABARAP se digieren proteolíticamente y se unen a las membranas autofagosómicas, donde contribuyen a la detección de la carga y a su reclutamiento en el fagóforo al unirse a diferentes receptores de autofagia o receptores de carga asociados a proteínas u orgánulos. En cuanto a los receptores de autofagia, podemos encontrar la proteína p62 (también conocida como sequestoma 1 o SQSTM1) que identifica proteínas u orgánulos ubiquitinilados destinados a eliminación o la proteína 3 que interactúa con la proteína BCL-2/adenovirus E1B (BNIP3), un receptor para mitocondrias destinadas a la mitofagia.

Así pues, como se muestra en la figura 4, los ATG se ensamblan en varios complejos: El complejo de iniciación ULK ya mencionado anteriormente, el complejo de nucleación PI3K de clase III y el

complejo de unión a PIP_3 , que dirige la distribución de la maquinaria que permite la formación de autofagosomas, e incluye los sistemas de conjugación ATG12 y LC3/GABARAPs. En el sistema de conjugación ATG12, la proteína ATG12 se une a ATG5, que a su vez se une a ATG16L1, interaccionando a continuación con el complejo de unión a PIP_3 (formado por proteínas de interacción con fosfoinosítidos de dominio repetido WD (WIPIs) y la proteína 1 que contiene el dominio FYVE de dedos de zinc o DFCP1). El complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 promueve entonces la conjugación de LC3 (o GABARAP), por lo que LC3 es escindida por la proteasa ATG4 para formar LC3-I, que luego se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-II (142,143) en un proceso mediado por ATG7 (144). Este conjugado se incorpora a las membranas preautofagosómicas y autofagosómicas, donde LC3 puede interactuar con receptores de carga que albergan motivos de interacción con LC3 (LIR). LC3-II permanecerá asociado a la doble membrana durante todo el proceso autofágico. Por ello, LC3 ha sido extensamente utilizado como marcador de autofagia (145). Finalmente, una vez el autofagosoma está formado, realizará su fusión con el lisosoma formando así el autolisosoma. Esta fusión está mediada por proteínas que ayudan a superar las dificultades energéticas del proceso, uniendo las dobles membranas del autofagosoma y del lisosoma (146). Dentro de estas, ATG14 o la proteína de membrana asociada al lisosoma 2 variante B (LAMP2B) así como la familia de proteínas LC3 son los principales involucrados en el proceso (147,148). De este modo, en el interior acidificado y gracias a la acción de enzimas líticas se degradará la carga presente en el interior del autolisosoma (149).

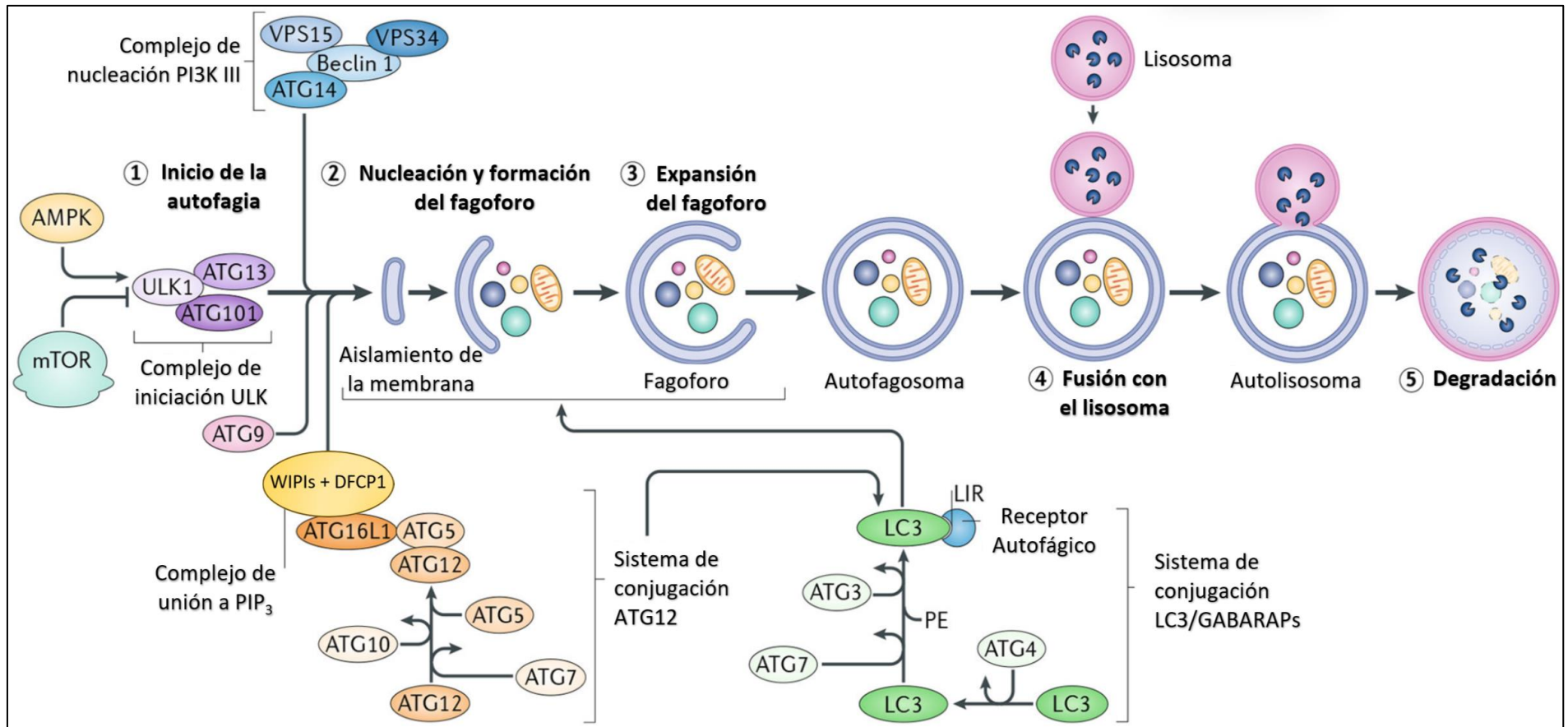


Figura 4. Proceso macroautofágico. El esquema refleja el proceso y la principal maquinaria regulatoria de la autofagia. Los sensores metabólicos AMPK y mTOR son los principales reguladores de la autofagia. El proceso autofágico puede ser resumido en 5 pasos, regulados por múltiples proteínas a las que se suele denominar proteínas relacionadas con la autofagia (ATGs). Las ATGs se ensamblan en varios complejos: el complejo de iniciación ULK, el complejo de nucleación PI3K de clase III y el complejo de unión a PIP₃. El complejo de unión a PIP₃ dirige la formación del autofagosoma lo que incluye a los sistemas de conjugación LC3/GABARAPs y ATG12. Adaptado de (138).

Autofagia y diabetes

La autofagia está controlada tanto por señales "inmunoespecíficas" como por señales más generales en respuesta al entorno nutricional (150). En este sentido, existen múltiples señales inmunitarias que regulan la autofagia, por ejemplo, la autofagia es desencadenada por varias familias de receptores de reconocimiento de patógenos como los receptores tipo toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR) y la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR), patrones moleculares asociados a daños (DAMP, como ATP, ERO y proteínas mal plegadas), JNK, TNF- α e IKK β y NF- κ B. Por otro lado, también puede ser inhibida por NF- κ B y citoquinas producidas por linfocitos T colaboradores de tipo 2 (150); y, como hemos comentado en apartados anteriores, todas las rutas mencionadas están relacionadas con la diabetes y sus complicaciones.

Por otro lado, las concentraciones elevadas de glucosa provocan estrés oxidativo y dañan diversas estructuras celulares si persisten en el tiempo. Así pues, la acumulación de orgánulos defectuosos dentro de la célula, como las mitocondrias, es un resultado esperado del deterioro de la autofagia. Como se ha comentado anteriormente, las mitocondrias son el principal lugar de producción de ERO, y un desequilibrio en la función citoprotectora y de reciclaje de la autofagia puede dar lugar a la acumulación excesiva de ERO (151).

En lo referente a las células beta pancreáticas, la autofagia es considerada un mecanismo protector. Debido a su función secretoria, la célula beta tiende a generar y acumular agregados proteicos, proceso agravado en un contexto de hiperglucemia y estrés oxidativo. Así, se ha demostrado que el proceso autofágico es esencial en la eliminación de estos agregados, siendo un mecanismo de defensa frente al estrés generado por la diabetes (152). Sin embargo, aunque la autofagia se considera un proceso fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y supervivencia de la célula beta, existen ciertos estudios que relacionan la muerte celular y pérdida de células beta pancreáticas con la autofagia (153,154). Por ejemplo, Masini y colaboradores observaron un nivel elevado de autolisosomas y vacuolas autofágicas en islotes pancreáticos provenientes de pacientes con DM2 en comparación con el grupo control. Además, se asoció la presencia de estos elementos con una mayor muerte de la célula beta. De este modo, se sugiere que la alteración de la autofagia en la DM2 puede estar relacionada con la pérdida de masa de células beta pancreáticas (154).

Relativo al tejido muscular, no existe un consenso generalizado sobre la regulación de la autofagia en la DM2. Por ejemplo, se ha observado una reducción en ciertos genes y proteínas relacionados con la autofagia en células musculares de pacientes con DM2 (155). Sin embargo,

otro estudio realizado en tejido cardíaco de individuos diabéticos tipo 2 señala que la autofagia está excesivamente activada, en concreto vía Beclina 1, lo que aumenta la apoptosis celular (156).

También contradictorios son los estudios realizados relativos al papel de la autofagia en los leucocitos de pacientes con DM2. Algunos estudios señalan que la autofagia se encuentra inhibida en esta línea celular, lo que supone el aumento de marcadores de inflamación (157). Otros estudios sugieren que la autofagia inducida por estrés oxidativo y estrés nitrosativo actúa como mecanismo de rescate en leucocitos de pacientes con DM2 que presentan dislipidemia (158) o que el bloqueo de la autofagia en leucocitos activados mediante palmitato causa la muerte por apoptosis (159). Por lo tanto, los resultados relativos a la autofagia en leucocitos de pacientes con DM2 son bastante dispares, y podrían variar en función del contexto celular y metabólico.

Autofagia selectiva

El proceso autofágico también puede mediar la degradación de material de forma específica. Este tipo de autofagia, denominada autofagia selectiva, se basa en el uso de determinados receptores que reconocen motivos o secuencias específicos de moléculas u orgánulos y los marcan para su degradación (160).

Existen diferentes tipos de autofagia selectiva en función de la carga que vaya a ser degradada. Así, podemos distinguir entre peroxifagia que hace referencia a la degradación autofágica de peroxisomas (161), reticulofagia que media la degradación selectiva del retículo endoplasmático (162) o lipidofagia responsable de la degradación de gotas lipídicas (163), entre otros. Especial mención requiere la mitofagia, proceso de marcaje y degradación autofágica de las mitocondrias, debido a la ya comentada importancia de las mitocondrias en las patologías metabólicas. Una de las principales rutas de iniciación de la mitofagia es la mediada por la quinasa PINK1 y la ubiquitina ligasa Parkin. En mitocondrias sanas, PINK1 es procesada y liberada a la matriz mitocondrial, sin embargo, ante la pérdida del potencial de membrana, PINK1 se acumula en la membrana externa mitocondrial reclutando a Parkin. La poliubiquitinación provocada por Parkin permite el anclaje de receptores específicos de autofagia como p62 o proteínas de la familia de proteínas LC3 que mediarán la formación del autofagosoma y la degradación de su contenido (164,165). Otros mecanismos de iniciación de la mitofagia en respuesta al daño mitocondrial son los mediados por las proteínas MIEAP, BNIP3 y BNIP3L (NIX) que regulan la reparación o degradación de mitocondrias dañadas (166).

1.6 Tratamiento antidiabético: Metformina

La metformina es el fármaco más prescrito a nivel mundial para el tratamiento de la DM2. Aunque los mecanismos de acción de la metformina están todavía bajo estudio, se han descrito numerosos efectos beneficiosos asociados: disminución de los niveles de glucosa y aumento de la sensibilidad a la insulina, mejoras en los marcadores de inflamación y en el perfil lipídico, así como reducción del peso corporal (167,168). Se sabe que la reducción en los niveles de glucosa circulantes está causada por la inhibición de la gluconeogénesis hepática, debido al aumento de la sensibilidad a la insulina (167).

La metformina entra en las células hepáticas a través del transportador de cationes orgánico (OCT) y puede difundirse hasta la mitocondria donde inhibirá al complejo I de la ETC, posiblemente estabilizándolo en una conformación de baja actividad (169) (Figura 5). Como consecuencia, se reduce el flujo de electrones con el consiguiente descenso en los niveles de ATP y, por tanto, aumentan la relación AMP/ATP y ADP/ATP activando a la quinasa AMPK. Este enzima es un regulador metabólico cuya activación, entre otros efectos, promueve la acción de la insulina. Por otro lado, el aumento de los niveles de AMP provoca una disminución en la síntesis de AMPc en respuesta al glucagón lo que indica una reducción, al menos parcial, en la ruta de señalización de esta hormona con la consiguiente bajada en los niveles de glucosa circulantes (170). Otro de los mecanismos implicados en la bajada de los niveles glucídicos es la inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP) (171). La estabilización del complejo I de la ETC también supone una reducción en la producción de ERO, aliviando así el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (172,173).

En lo que respecta a los efectos de la metformina en la salud cardiovascular, se ha demostrado que presenta efectos positivos en pacientes diabéticos tipo 2 (174). Sin embargo, estos efectos beneficiosos sobre el corazón y la vasculatura no se deben únicamente a las mejoras en el control glucémico, sino que es consecuencia de múltiples interacciones con el sistema cardiovascular. Así, aunque no se conocen los mecanismos exactos, se han observado propiedades antiaterogénicas, antiinflamatorias y de mejora de la función endotelial (175,176).

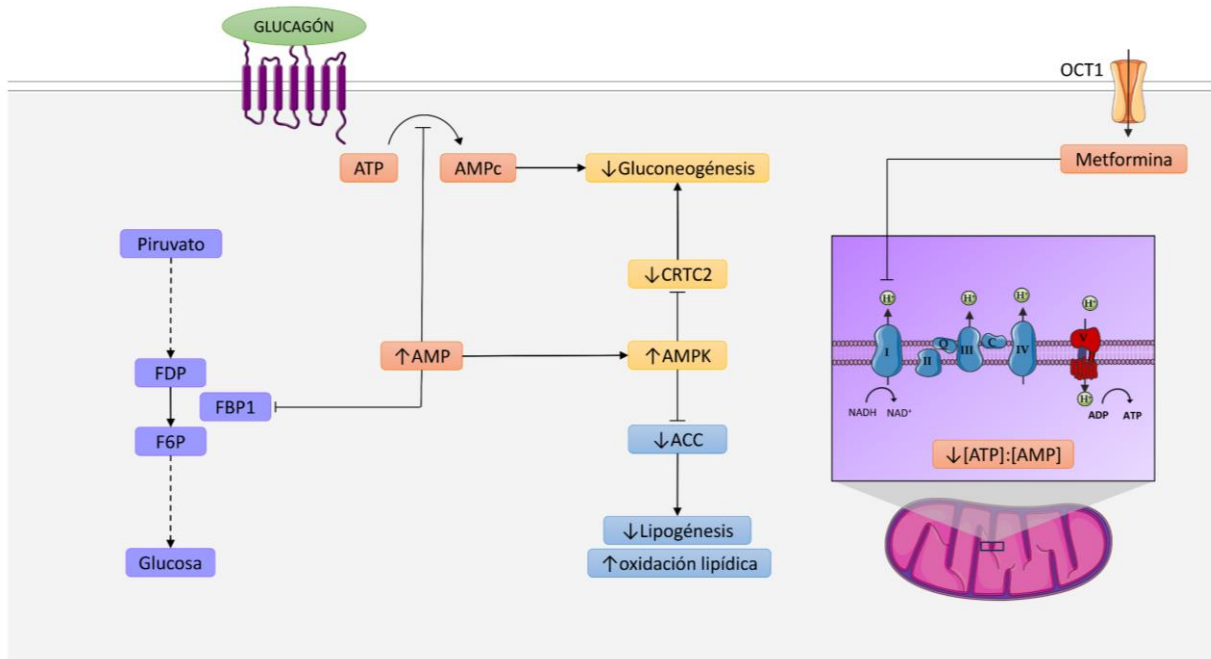


Figura 5. Mecanismo de acción de la metformina. Tras la inhibición del complejo I, la quinasa AMPK se activa por el aumento de los niveles de AMP, lo que conduce a la inhibición de CRT2 e impide la formación del complejo CREB-CBP-CRTC2 (recuadros ámbar) limitando la gluconeogénesis. Por otro lado, AMPK también fosforila e inhibe ACC1 y 2, lo que promueve la oxidación de AGL y disminuye la lipogénesis (recuadros azules). Los niveles elevados de AMP impiden la producción de AMPc estimulada por el glucagón y, por tanto, antagoniza la acción del glucagón hepático (recuadros rosas). El AMP también inhibe alostéricamente la FBP1, que inhibe directamente la vía gluconeogénica (recuadros morados).

1.7 Otras estrategias para el tratamiento de la DM2: nanopartículas de oro-óxido de cerio

El uso de nanopartículas en biomedicina es un área de investigación muy activa ya que podría proporcionar nuevos sistemas terapéuticos para el tratamiento de diabetes, cáncer y otras enfermedades que cursan con estrés oxidativo y/o disfunción mitocondrial (177,178). Los principales motivos para usar nanopartículas como agentes terapéuticos son: (i) pueden penetrar membranas biológicas, (ii) se puede incluir un agente activo en su formulación y (iii) se pueden dirigir a un determinado tejido diana usando moléculas ancladas a la estructura de la nanopartícula.

Existen numerosos estudios donde se han explorado una gran cantidad de nanopartículas metálicas y poliméricas, mientras que se ha prestado menos atención a las partículas de óxidos metálicos. Este hecho probablemente se debe a que es más difícil obtener

este tipo de nanopartículas del tamaño adecuado. Entre los diferentes tipos de nanopartículas, las que contienen óxido de cerio (CeO_2) son especialmente prometedoras debido a su versatilidad y propiedades fisicoquímicas (179). En este contexto, hay estudios que describen la biocompatibilidad de las nanopartículas de CeO_2 así como su capacidad para descomponer ERO generadas bajo situaciones de estrés oxidativo en la célula (180–182). De esta forma, se han estudiado *in vivo* e *in vitro* como “quenchers” o secuestradores de ERO en diferentes tipos de células, por ejemplo, se ha demostrado que son capaces de rescatar a las células HT22 (línea celular de neuronas de ratón) de muerte causada por estrés oxidativo (183). También se han demostrado sus efectos protectores frente a radiación en células mamarias (184), cardioprotectores (185) y reductores de la inflamación endotelial debido a su actividad catalítica que mimetiza la actividad SOD (186).

Esta capacidad antioxidante puede incrementarse cuando las nanopartículas se combinan con ciertos metales, como la plata, el platino o el oro (Au) (187,188). Estas combinaciones han demostrado tener propiedades biocompatibles, y además pueden actuar como eliminadores de ERO y actividades tipo catalasas, modulando así las condiciones de estrés oxidativo (189–191). De esta manera, el tratamiento de diferentes enfermedades humanas puede beneficiarse de la nanoterapia, entre ellas la DM2. En lo relativo a las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas, aquellas que contienen oro en su formulación se encuentran entre las más prometedoras (192). En este sentido, las nanopartículas de oro han demostrado efectos beneficiosos en modelos animales de diabetes, al disminuir los niveles de enzimas hepáticas, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 (193), o restableciendo los niveles normales de glucemia, glucógeno e insulina (194). Además, las nanopartículas de oro pueden conjugarse con metformina, habiéndose demostrado sus acciones beneficiosas al inhibir la producción de AGE, así como reduciendo los productos finales de glucosilación y el contenido en grupos carbonilos entre otros (195).

Como se ha comentado anteriormente aunque la etiología de la resistencia a la insulina y la DM2 es intrincada, diferentes estudios han señalado que las ERO pueden inducir estrés oxidativo y, exacerbar la resistencia a la insulina (196,197), lo que pone de manifiesto el potencial terapéutico de los antioxidantes. En este sentido, abundan las pruebas, tanto *in vitro* como *in vivo*, que apoyan el potencial de las nanopartículas de oro como antioxidantes (198) en modelos de DM2 (199), entre otros.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Una vez establecido que la DM2 cursa con disfunción mitocondrial, nos planteamos la hipótesis de que, mediante aproximaciones farmacológicas como la metformina (primera línea de tratamiento de esta patología) o el uso de nanopartículas con capacidad antioxidante se podría proteger y rescatar a los leucocitos de pacientes con DM2 de la disfunción mitocondrial y las alteraciones moleculares que presentan.

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto de la metformina sobre la función mitocondrial en PBMCs de pacientes con DM2. Analizar el estado de los complejos mitocondriales de la ETC y los niveles de ERO mitocondriales. Estudiar el estado de activación de la mitofagia en PBMCs de pacientes diabéticos tipo 2 así como el efecto del tratamiento con metformina.
2. Analizar la morfología mitocondrial en PBMCs de individuos diabéticos tipo 2 así como los niveles de citoquinas proinflamatorias en suero. Valorar los efectos de la metformina sobre ambos.
3. Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas de oro-óxido de cerio y establecer un porcentaje de oro óptimo para modular las interacciones leucocito-endotelio alteradas en la DM2.
4. Estudiar la biocompatibilidad de las nanopartículas de oro-óxido de cerio, así como su efecto sobre la producción de ERO, la inflamación y la autofagia en un contexto de interacción leucocito-endotelio en la DM2.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Metformina, función mitocondrial y mitofagia

3.1.1 Sujetos y muestra

Para este estudio, se reclutaron 101 sujetos sanos y 141 pacientes diabéticos tipo 2 del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia (España). En el momento de reclutamiento, 93 de los 141 pacientes diabéticos tipo 2 habían recibido un tratamiento de 1700 mg diarios de metformina por al menos un año. El estudio fue aprobado por el comité de ética del centro, cumpliendo con los principios de la declaración de Helsinki y habiendo firmado todos los pacientes su respectivo consentimiento informado. Para la inclusión en el grupo de DM2 se siguieron los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Diabetes. Los criterios de exclusión del estudio fueron: IMC superior a 35, antecedentes de enfermedad cardiovascular, presencia de enfermedades autoinmunes, infecciosas, hematológicas o cáncer. Los sujetos control se reclutaron a través de campañas publicitarias en redes sociales y otros medios de difusión, incluyéndose sujetos mayores de 35 años que vivieran en Valencia, España y sin diagnóstico de DM2.

3.1.2 Recolección de muestras y determinación de parámetros antropométricos y bioquímicos

Todos los pacientes reclutados para el estudio acudieron al Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Doctor Peset tras al menos 12 horas de ayuno y no habiendo tomado ningún fármaco antiinflamatorio en las 24 horas anteriores. El Servicio de Enfermería servicio se encargó de la obtención de los valores antropométricos (peso, talla, presión arterial, diámetro de cintura y diámetro de pelvis) a la par que extrajo 30mL de sangre periférica. Los parámetros bioquímicos determinados fueron: ensayo inmunológico para la determinación de los niveles de insulina (Architect Insulin Reagent Kit, Chicago, IL, EE. UU.); medición de los niveles de glucosa mediante el método enzimático automático con el dispositivo Beckman Synchron LX20 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA); medición de los niveles de HbA_{1c} con el analizador automático (Arkay Inc., Kyoto, Japan); y otros ensayos enzimáticos para la medición del colesterol total, HDL y niveles de triglicéridos. Tras esto, se calculó el modelo homeostático de nivel de resistencia a la insulina (HOMA-IR) mediante la fórmula: $\text{insulina en ayunas } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mg/dL}) / 405$. Los niveles de LDL se calcularon mediante la fórmula de Friedewald.

3.1.3 Aislamiento de PBMCs

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de 8 mL de sangre periférica anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mediante un método inmunomagnético (MACSprep Leukocyte Isolation Kit, kit humano, Cat. Número 130-115-169, Milteny Biotech, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. La posible contaminación con eritrocitos se eliminó utilizando solución de lisis de hematíes (Milteny Biotech). La dilución de leucocitos resultante se resuspendió en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se alicuotó según fuera necesario para los experimentos posteriores.

3.1.4 Ensayo de citometría de flujo

200 μ L de los leucocitos aislados previamente se marcaron con 5 μ L de anticuerpo APC-CD45 (BD Pharmingen APC-mouse anti human CD45. CAT número 555485 BD Biosciences, NJ, EE.UU.) y se incubaron durante 15 minutos. A continuación, se añadió 1 μ M de MitoSox (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE.UU.) y se incubó durante 10 minutos. La fluorescencia se midió en un citómetro C6 Accuri (BD Biosciences, NJ, EE.UU.) con un láser azul (488 nm) y un filtro FL3 (585/40 nm) (mitoSOX Ex/Em = 510/580). Se analizaron 10.000 células en cada experimento, y la fluorescencia registrada se relativizó con la de un control interno consistente en células U937 que habían sido sometidas al mismo protocolo.

3.1.5 Ensayo de expresión proteica

Se extrajo proteína proveniente de los leucocitos anteriormente aislados siguiendo un protocolo de tampón de lisis RIPA. Los pellets se resuspendieron en 50-80 μ L de tampón RIPA, se incubaron durante 15 min en hielo y se centrifugaron durante 15 min a 14.000 g y a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas siguiendo el ensayo de cuantificación de proteínas BCA (Pierce-Thermo Scientific, MA, EE. UU.). A continuación, se separaron 25 μ g de las proteínas obtenidas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad, CA, EE. UU.). Las membranas se bloquearon y las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos específicos diluidos en tampón de bloqueo contra PINK1 (Sigma-Aldrich, Wis., EE.UU) Ref. sab1411281, dilución 1/1000), Parkin (Abcam, Cambridge, Reino unido, Ref. ab77924, 1/500), NBR1 (Abcam Ref. 16004-1-AP, 1/1000), BNIP3L/NIX (Sigma-Aldrich, Ref. N0399, 1/1000), mTFA (Santa Cruz, España, Ref. sc-376672, 1/1000), PGC1 α (Abcam, Ref. ab54481, 1/1000), AMPK (Abcam, Ref. ab80039, 1/1000), P-AMPK (Abcam, Ref. ab133448 1/1000), VDAC (Abcam, Ref. ab14734, 1/1000) y OXPHOS cóctel de anticuerpos humanos (Abcam, Ref. ab110411, 1/1000, que detecta las subunidades NDUFB8, SDHB, UQCRC2, COXII y ATP5A de los complejos I-V, respectivamente). Los anticuerpos secundarios específicos

(anticuerpo anti-conejo de cabra (Ref. PI-1000) de Vector Laboratories (Burlingame, CA, EE.UU.) y anticuerpo anti-ratón de cabra (Ref. 31420, Pierce-Thermo Scientific) se incubaron durante 60 min. La señal de la proteína se obtuvo utilizando el reactivo quimioluminiscente SuperSignal West Pico Plus (Ref. 34580) o Femto (Ref. 34095) (ambos de Pierce-Thermo Scientific) y el sistema de obtención de imágenes Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, Francia). La cuantificación densitométrica se realizó con el software Bio1D (Vilber Lourmat). La señal de cada proteína se relativizó con respecto a un control interno consistente en un conjunto de proteínas de células U937 utilizado para comparar los resultados de los distintos experimentos. Además, algunas de las membranas se cortaron con la guía del marcador de peso molecular para analizar diferentes proteínas en el mismo experimento.

3.1.6 Microscopía electrónica de transmisión

Para la ejecución de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), una alícuota de sangre total (1 mL) se diluyó en solución de Karnovsky (1:4) y se incubó durante 30 minutos; a continuación, se separaron los leucocitos mediante el protocolo anteriormente mencionado. Los leucocitos se centrifugaron a 400 g durante 10 min y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó una vez con PBS y, tras la centrifugación, se resuspendió cuidadosamente en 500 μ L de solución de Karnovsky y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se almacenó a 4 °C hasta que se procesó para la TEM. La tinción TEM, la inclusión y las secciones ultrafinas fueron realizadas por el Servicio de Microscopía de la Universidad de Valencia. La observación y el registro de las imágenes se realizaron con el microscopio JEM - 1010 (JEOL, Tokio, Japón) a un aumento de 7000x y un voltaje de 100 kV.

3.1.7 Medición de niveles de citoquinas en suero

Los niveles séricos de TNF- α e IL-6 se midieron con un sistema de análisis Luminex® 200 (Austin, TX, EE. UU.) siguiendo el procedimiento del fabricante del Milliplex® MAP Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.). Los coeficientes de variación intraserial e interserial fueron <5,0 % y <20,0 %, respectivamente.

3.1.8 Análisis estadístico

La distribución normal de las muestras se confirmó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov o la prueba de Saphiro-Wilk, en función del tamaño de la muestra. Los datos de distribución normal y no normal se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (SD) y mediana $\pm$ (percentiles 25-75), respectivamente. Se empleó un ANOVA unidireccional y una prueba post-hoc de Tukey para comparar los 3 grupos. La posible influencia de la edad y el IMC

se corrigió mediante el modelo lineal general univariante introduciendo estos parámetros como covariables. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$, con un intervalo de confianza del 95 %. El análisis se realizó con SPSS 25.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, EE. UU.), y se utilizó GraphPad (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.) para representar los datos con gráficos de barras, que representan la media y el error estándar de la media (SEM).

3.2 Nanopartículas Au/CeO₂ interacciones leucocito endotelio e inflamación

3.2.1 Sujetos, muestra y parámetros bioquímicos

Para esta segunda parte del estudio doctoral se reclutó una cohorte de 57 pacientes con DM2 en el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia, España) también diagnosticados según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes y 51 controles sanos.

Los criterios de inclusión fueron una edad entre 40 y 70 años y una evolución de la diabetes de más de 10 años. Los criterios de exclusión del estudio fueron: IMC superior a 35, antecedentes de enfermedad cardiovascular, presencia de enfermedades autoinmunes, infecciosas, hematológicas o cáncer. Todos los sujetos fueron informados de los procedimientos y parámetros evaluados y dieron su consentimiento informado por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Dr. Peset y se realizó de acuerdo con la declaración de principios éticos para la investigación médica de la Declaración de Helsinki.

Los parámetros antropométricos y bioquímicos estudiados fueron obtenidos de forma similar a la descrita en el apartado 3.1.2.

3.2.2 Aislamiento de células polimorfonucleares

Las células polimorfonucleares (PMN) se obtuvieron a partir de muestras de sangre heparinizada. En primer lugar, la muestra de sangre total se incubó durante 45 min con un volumen 1:2 de solución de dextrano (3 %) en NaCl (0,9 %; Sigma Aldrich, MO, EE. UU.), y el sobrenadante se centrifugó sobre Fycoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) durante 25 min a 650 g. A continuación, el precipitado resultante se incubó con tampón de lisis para eliminar los eritrocitos restantes (5 min a RT) y se centrifugó a 250 g. Por último, los pellets que contenían PMN se lavaron dos veces y se resuspendieron con solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Sigma Aldrich, MO, EE. UU.) o medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma Aldrich, MO, EE. UU.) en función de su uso experimental. Además, se utilizó LUNA-FL (Logos Biosystems Inc., Annandale, VA EE. UU.) para determinar el recuento celular y la

viabilidad (doble tinción con naranja de acridina y yoduro de propidio). Para los estudios de proliferación y viabilidad se empleó una línea celular humana de tipo macrófago (U937).

3.2.3 Aislamiento de células endoteliales humanas

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) se obtuvieron a partir de cordones umbilicales mediante tratamiento con colagenasa de tipo II. En los experimentos posteriores se utilizó el pase 1 del cultivo primario. Para los estudios de adhesión, las HUVECs se cultivaron en cubreobjetos de plástico de 25 mm hasta que alcanzaron la confluencia (aproximadamente 48 h).

3.2.4 Caracterización de las nanopartículas

La evaluación de la fotoluminiscencia se realizó en una solución que contenía acetonitrilo a temperatura ambiente en celdas de cuarzo tapadas con septum y purgadas con N₂, utilizando una lámpara de mercurio dopada con Xe, un espectrofluorómetro Edinburgh FL3000 y un monocromador Czerny-Turner.

Las imágenes y medidas de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se realizaron con el equipo JEOL JEM-2100F (JEOL, Tokio, Japón), bajo un voltaje de aceleración de 200 kV. Las muestras se prepararon aplicando una gota del material suspendido en etanol sobre una rejilla TEM de cobre recubierta de carbono y dejándola secar a temperatura ambiente. Los espectros de fotoelectrones de rayos X (XPS) se midieron en un espectrómetro SPECS equipado con un detector Phoibos 150-MCD-9 y utilizando una fuente de rayos X no monocromática de Al K (1486,6 eV). Los espectros se registraron a 200 °C, utilizando una energía de paso del analizador de 30 eV y una potencia de rayos X de 50 W, y las muestras se evaluaron en la precámara del espectrómetro a 1×10^{-9} mbar. Las relaciones de intensidad medidas de los componentes se obtuvieron a partir del área de los picos correspondientes tras la sustracción de fondo no lineal de tipo Shirley, corregida por la función de transición del espectrómetro. Durante el procesamiento de datos de los espectros XPS, los valores de energía de enlace se referenciaron a la señal C1s.

En lo respectivo a la síntesis de las nanopartículas de oro-óxido de cerio, a menos que se indique lo contrario, los disolventes y reactivos se adquirieron en Merck (MO, EE. UU.) y se utilizaron tal como se recibieron. La síntesis de Au/CeO₂ se realizó por impregnación de los catalizadores de oro sobre las nanopartículas de CeO₂, siguiendo el siguiente procedimiento. En primer lugar, se combinaron 5 g de CeO₂ con una solución de 0,90 g de tetracloroaurato de sodio (NaAuCl₄) en 40 mL de H₂O (miliQ). La suspensión se agitó durante 12 h a temperatura ambiente,

tras lo cual se evaporó todo el líquido y el sólido se secó a 100 °C durante 3 h. A continuación, el sólido se redujo y activó vertiéndolo en 1-feniletanol (60 ml) hirviendo a 160 °C durante 3 h. A continuación, el catalizador se filtró y se lavó consecutivamente con agua (lavados exhaustivos con 3 L de agua destilada), acetona (100 ml) y éter dietílico (50 ml) y se secó al vacío a 100 °C durante 2 h. El análisis de oro por fluorescencia XR reveló que el contenido en oro era de aproximadamente 0,82 % en peso, cercano al valor óptimo. Se prepararon otros catalizadores Au/CeO₂ con mayores concentraciones de oro siguiendo el procedimiento mencionado, pero utilizando mayores cantidades de NaAuCl₄.

Se prepararon cuatro lotes de nanopartículas con cantidades variables de oro (10, 4,4, 1,79 y 0,82), expresadas en % del peso total en el Instituto de Tecnología Química (ITQ, Valencia, España).

3.2.5 Evaluación dinámica de las interacciones leucocito-endotelio

En primer lugar, evaluamos la capacidad antiinflamatoria de los distintos lotes de nanopartículas (10, 4,4, 1,79 y 0,82) de oro en % del peso total, a la misma concentración (0,02 mg/mL). Se emplearon 1,2 mL de la solución de PMN anteriormente aislada con una densidad de 10⁶ células/mL en RPMI completo. Entre tres y cuatro días antes del experimento, se prepararon cultivos primarios de HUVECs según lo descrito en el apartado 3.2.3. Los PMN se hicieron pasar a lo largo de la monocapa de HUVECs a una velocidad de 0,3 mL/min durante 5 minutos y se registraron todos los eventos durante este tiempo. Así, la velocidad de rodamiento de los PMN se evaluó midiendo el tiempo que tardaban en recorrer 200 micrómetros. El flujo de rodamiento de PMN se evaluó durante un período de 1 minuto y la adhesión se determinó contando los PMN adheridos al endotelio en 5 campos separados durante un período de al menos 30 s.

3.2.6 Evaluación estática de las interacciones leucocito endotelio

Para este ensayo, realizamos una versión modificada del ensayo de adhesión leucocitaria-endotelial realizado por Kiely y colaboradores (200). En primer lugar, se aislaron PMN y se marcaron con 2 μM de 2', 7'-Bis-(2-carboxietil)-5(γ-6) carboxifluoresceína, acetoximetil éster (BCECF-AM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una concentración final de 2x10⁶ células/mL. Simultáneamente, se sembraron HUVECs en placas de cultivo de 96 pocillos (Costar) y se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia. 3 horas antes del ensayo, las HUVECs se trataron con dimetilsulfóxido (DMSO) (0,141 M), TNF-α (5 ng/mL) y nanopartículas de Au/CeO₂ (0,02 mg/mL). A continuación, las HUVECs se lavaron una vez con RPMI + 1 % de

siero bovino fetal (FBS) y se añadieron 100 μ L de la suspensión de PMN marcada con BCECF-AM a cada pocillo, permitiendo que PMN y HUVECs interactuaran durante 45 minutos. A continuación, se retiraron los PMN y cada pocillo se lavó tres veces con HBSS para eliminar los PMN no adheridos. Por último, el contenido de los pocillos se solubilizó en 150 μ L de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS en agua, pH 8,2-8,4) y las placas se midieron con el lector de microplacas Synergy Mx (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Alemania).

3.2.7 Viabilidad celular y proliferación

Para la realización de este ensayo se sembraron células U937 (ATCC® CRL1593.2™) en placas de 24 pocillos a razón de 100.000 células/pocillo en medio RPMI suplementado con un 10 % de FBS. Una vez alcanzada la confluencia se administró tratamiento con Au/CeO₂ o DMSO durante 3 horas, tras lo cual se renovó el medio y se permitió a las células proliferar durante 3 días. A las 24, 48 y 72 h se analizaron las células con el contador LUNA-FL para evaluar el número de células y la viabilidad (doble tinción con naranja de acridina y yoduro de propidio). Todos los tratamientos y mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.8 Evaluación de apoptosis celular

Para la medición de apoptosis, se sembraron células U937 en placas de 24 pocillos a 500.000 células/pocillo en RPMI suplementado con un 10 % de FBS. El tratamiento con Au/CeO₂ o DMSO se administró durante 3 horas, tras lo cual se renovó el medio y las células se cultivaron durante 21 horas más. El inductor de la apoptosis estaurosporina (STS) se utilizó como control positivo de muerte celular. Para el ensayo se empleó el Kit de detección de apoptosis FITC anexina V (AnnV) (BD Biosciences, CA, EE. UU.). Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y se resuspendieron en tampón de unión (provisto por el kit) a una concentración de 1×10^6 células/mL. Posteriormente, se transfirieron 100 μ L de la solución (1×10^5 células) a un tubo de cultivo de 5 mL, al que se añadieron 5 μ L de FITC anexina V y 5 μ L de yoduro de propidio (PI). Finalmente, se evaluó mediante citometría de flujo la presencia de cuatro poblaciones: apoptótica (AnnV+/PI-), vital (AnnV-/PI-), apoptótica tardía/necrótica (AnnV+/PI+) y células dañadas (AnnV-/PI+).

3.2.9 Medición de producción total de ERO

Los PMN se sembraron en placas de 48 pocillos y se trataron después de 24 h con las nanopartículas a una concentración de 0,02 mg/mL durante 3 h. La producción total de ERO se evaluó mediante fluorescencia (IX81 Olympus, Hamburgo, Alemania) tras 30 min de incubación en HBSS (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Sant Cugat del Vallés, España) con 5 μ M Hoechst

33342 (para núcleos) y 5 μ M 2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA para ERO) (ambos de Sigma-Aldrich, Madrid, España). Así, las células se lavaron dos veces con HBSS y se registraron un total de 20-30 imágenes por pocillo con un microscopio de fluorescencia acoplado a un software de citometría estática ("ScanR" versión 2.03.2, IX81 Olympus). Los controles se realizaron utilizando HBSS.

3.2.10 Análisis de expresión proteica

En primer lugar, se aislaron los PMN como se describe en la sección 3.2.2 y se resuspendieron hasta alcanzar una concentración final de 1×10^6 células/mL. Simultáneamente, se sembraron HUVECs en matraces de 25 cm² y se cultivaron hasta que alcanzaron la preconfluencia. Tres horas antes del ensayo, las HUVECs se trataron con nanopartículas de Au/CeO₂ al 0,82 % (0,02 mg/mL). A continuación, se añadieron 5 mL de la suspensión de PMN a cada matraz y se dejó que interactuaran con las HUVECs durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, los PMN y las HUVECs se almacenaron por separado. A continuación, los pellets de HUVECs se incubaron en tampón RIPA (Thermo Fisher Scientific,) con un cóctel de inhibidores de proteasas (San Luis, MO, EE. UU.). A continuación, los tubos se agitaron en vórtex y se sonicaron 3 veces, durante 10 segundos cada vez, para romper las membranas celulares, y se centrifugaron a 14000 x g durante 15 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C para su uso posterior. Se utilizó un kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific) para determinar la concentración de proteínas y se cargaron 25 μ g de proteínas por muestra en geles de poliacrilamida-SDS al 4-20 %. La electroforesis en gel se llevó a cabo a 150 V, durante 90 min, tras lo cual las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) a 400 mAp durante 1 h. A continuación, las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en leche descremada al 5 % en tampón TBS-T que contenía 150 mM de cloruro sódico, 0,1 % de Tween20 y 25 mM de Tris a pH 7,5. Tras eliminar el exceso de tampón de bloqueo, las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo policlonal de conejo anti NF- κ B (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anticuerpo policlonal de ratón antiactina (Cell Signaling, Massachusetts, EE.UU.), y posteriormente con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano de cabra anti-conejo (Millipore Ibérica, Madrid, España) o de cabra anti-ratón (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.), según procediera, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, se evaluó la expresión proteica con un reactivo ECL plus (GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont, Reino Unido) o Supersignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) utilizando el sistema de adquisición Fusion FX5 (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, Francia) para la detección de la señal de quimioluminiscencia. Los datos se analizaron por densitometría utilizando el software Bio1D

(Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, Francia). Todos los valores de expresión proteica se normalizaron con respecto a los de actina en la misma muestra y con el control interno incluido en cada ensayo.

3.2.11 Análisis estadístico

Todos los análisis de datos se realizaron con SPSS 25.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados de las variables paramétricas y no paramétricas se expresaron como media $\pm$ SD y mediana $\pm$ (percentiles 25-75), respectivamente. El análisis estadístico se realizó con una prueba t de Student para los datos distribuidos normalmente, una prueba U de Mann-Whitney para los valores no distribuidos normalmente y una prueba chi-cuadrado para la proporción de frecuencias. Además, la influencia del IMC en los parámetros bioquímicos se evaluó con un modelo lineal general univariado utilizando el IMC como covariable. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial y la mitofagia en PBMCs de pacientes con DM2

4.1.1 Parámetros antropométricos y bioquímicos

*Tabla 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los sujetos de control y de los pacientes diabéticos de tipo 2 tratados o no con metformina. Los valores se reflejan como las medias y desviaciones estándar para los datos distribuidos normalmente, mientras que la mediana y los cuartiles 25 y 75 se muestran para los datos no distribuidos normalmente. Las comparaciones entre grupos se realizaron con ANOVA y la prueba posterior de Tukey. Los datos no distribuidos normalmente se compararon con la prueba de prueba de Kruskal-Wallis. La influencia de la edad, el IMC y la HbA_{1c} se comprobó y corrigió con la corrección del modelo lineal multivariante. * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs DM2.*

	Control	DM2	DM2 + metformina	Corrección por edad e IMC	Corrección por HbA _{1c} (%)
N	101	48	93		
Hombres (%)	45	48	55		
Edad (años)	55±10	60±11	60±9	-	
IMC (kg/m ²)	24,83±4,42	29,59±5,31*	29,70±4,62*	-	
Circunferencia cintura (cm)	82,69±13,49	100,34±13,06*	102,38±11,21*	*	*
Índice cintura-cadera	0,83±0,09	0,93±0,08*	0,96±0,07*	*	*
Presión arterial sistólica (mm Hg)	122,00±20,33	142,74±20,61*	139,16±14,59*	*	*
Presión arterial diastólica (mm Hg)	74,54±12,07	81,58±11,75*	79,33±9,82*	*	*
Insulina (μUI/mL)	7,42±5,18	16,58±9,37*	16,37±12,11*	*	*
HOMA-IR	1,67±1,28	5,56±4,06*	5,27±4,25*	*	*
HbA _{1c} (%)	5,27±0,30	7,16±1,56*	6,66±0,69*#	*	-
Glucosa (mg/dL)	89,60±10,71	135,48±40,53*	131,40±32,87*	*	*

<i>Colesterol Total(mg/dL)</i>	194,28±34,77	175,43±39,77*	168,21±38,56*	*	*
<i>HDL (mg/dL)</i>	56,15±14,11	46,73±12,81*	44,34±10,59*	*	*
<i>LDL (mg/dL)</i>	118,30±28,78	104,38±33,53*	97,06±33,54*	*	*
<i>VLDL (mg/dL)</i>	14,5 (11,75-23)	20,5 (15-30)*	24 (18-33,7)*	*	*
<i>CT/HDL</i>	3,44±1,02	3,98±1,19	3,94±1,12	*	*
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	73 (58,5-116)	102 (76-150)*	127 (92-169,8)*	*	*
<i>Colesterol no-HDL</i>	138,12±33,64	129,67±36,66	123,86±37,38*	*	*

En primer lugar, evaluamos las alteraciones en las medidas antropométricas y bioquímicas de nuestra cohorte de pacientes y sus correspondientes controles, que mostraron rasgos típicos de la DM2 (Tabla 2). En cuanto a las medidas antropométricas, se observan las alteraciones metabólicas características de la DM2, como un mayor IMC, perímetro de cintura e índice cintura-cadera, todos ellos signos de sobrepeso u obesidad. El sobrepeso suele estar relacionado con la hipertensión, tal y como se observó en nuestra población de pacientes diabéticos tipo 2, que mostró una presión arterial sistólica y diastólica significativamente más elevadas que la población control. En cuanto a los parámetros del metabolismo hidrocarbonado, los pacientes diabéticos de tipo 2 mostraron niveles más elevados de insulina y del índice HOMA-IR que nuestros sujetos sanos. Esto concuerda con los rasgos clásicos de la DM2; de hecho, nuestros pacientes diabéticos de tipo 2 también mostraron un porcentaje de HbA_{1c} y unos niveles de glucosa más elevados en comparación con los sujetos no diabéticos. Paralelamente a las alteraciones del metabolismo de la glucosa, también se observaron perturbaciones del metabolismo lipídico, aunque algunas de las alteraciones se atribuyeron al tratamiento con estatinas. En este sentido, los niveles de colesterol y LDL eran más bajos en los pacientes diabéticos de tipo 2, probablemente debido al efecto hipolipemiante de las estatinas. Sin embargo, los niveles de HDL eran más bajos y los de VLDL y triglicéridos más elevados en pacientes con DM2, lo que refleja en parte las alteraciones lipídicas clásicas que pueden conducir a una dislipidemia aterogénica. El tratamiento con metformina en pacientes diabéticos de tipo 2 redujo la HbA_{1c}, demostrando así su marcada capacidad hipoglucemiante a largo plazo.

Se ajustó el análisis estadístico para evaluar la influencia del IMC y la edad en los parámetros analizados, así como la reducción de HbA_{1c} observada tras el tratamiento con metformina, confirmándose que las diferencias seguían siendo significativas.

4.1.2 Efecto de la DM2 y la metformina sobre la cadena de transporte de electrones y el balance oxidativo en PBMCs

El proceso de fosforilación oxidativa, realizado por los complejos de la ETC, es de crucial importancia para la homeostasis celular. Por ello, evaluamos los niveles de los diferentes complejos proteicos que conforman la ETC y de un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), como se muestra en la Figura 6. La expresión de VDAC no cambió en ninguno de los grupos (Figura 6A). Los complejos de la ETC, con la excepción del complejo IV, mostraron un efecto similar: su expresión se redujo en los leucocitos de pacientes diabéticos tipo 2 (Figura 6B-F; $p<0,05$ para los complejos I, II y V; $p<0,01$ para el complejo III), mientras que en los leucocitos de pacientes diabéticos tipo 2 tratados con metformina los niveles eran similares a los de los leucocitos de sujetos sanos y superiores a los de los pacientes diabéticos tipo 2 sin tratamiento con metformina ($p<0,05$; para los complejos I, II, III, IV y V) (Figura 6B-F).

Las alteraciones de función en la ETC suelen conducir a un exceso de producción mitocondrial de ERO. Por ello, medimos este parámetro mediante la sonda de fluorescencia MitoSOX y observamos que las mitocondrias de los leucocitos de los pacientes diabéticos de tipo 2 tenían más ERO ($p<0,05$) que las de los sujetos control, y que el tratamiento con metformina hacía que los niveles de ERO mitocondriales se restablecieran por completo ($p<0,001$) (Figura 6G y H).

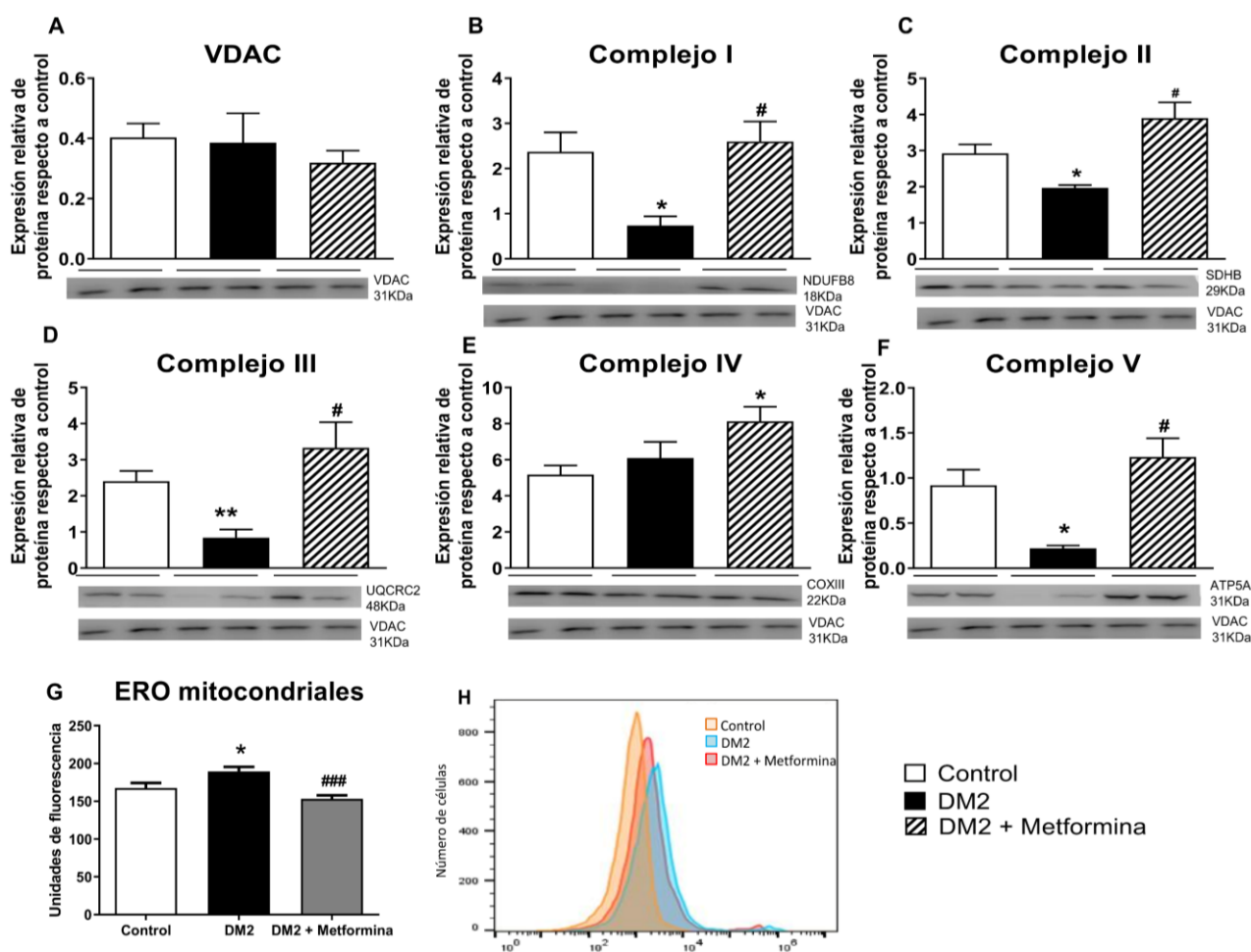


Figura 6. Expresión proteica de los complejos de la ETC y producción mitocondrial de ERO en pacientes diabéticos de tipo 2 y sujetos control (A-F). Los gráficos de barras muestran las mediciones de los complejos ETC relativizadas a los niveles de proteína VDAC y a un control interno. Se muestran imágenes representativas de western blot (WB), y la cuantificación se realizó con al menos 20 muestras para cada grupo. G) Gráfico de barras que muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de MitoSOX, en relación con los niveles del control interno, evaluados por citometría de flujo. H) Histograma representativo de los tres espectros de los grupos analizados. El histograma naranja representa a los sujetos sanos, el azul a los pacientes con diabetes de tipo 2 y el rojo a los pacientes con diabetes de tipo 2+metformina. Los valores representan media±SEM. Las comparaciones se realizaron con ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey. * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ vs Control; # $p<0,05$ y ### $p<0,001$ vs DM2.

4.1.3 Marcadores de mitofagia alterados en pacientes con DM2 y efecto de la metformina

A continuación, exploramos los efectos de la metformina sobre la calidad mitocondrial, para lo cual evaluamos la expresión proteica de varios marcadores de mitofagia y biogénesis mitocondrial (Figura 7). Los niveles proteicos de PINK1 y Parkin (Figura 7A, B), dos iniciadores de

la mitofagia, se redujeron en los leucocitos de pacientes diabéticos de tipo 2 ($p<0,05$). Paralelamente, analizamos la proteína de carga mitofágica NBR1 (Figura 7C), cuyos niveles proteicos no estaban alterados en los leucocitos de los pacientes diabéticos de tipo 2. En los pacientes tratados con metformina, los niveles proteicos de NBR1 no estaban alterados. En los pacientes tratados con metformina, la expresión de PINK1, Parkin y NBR1 fue significativamente mayor que en los pacientes no tratados ($p<0,05$). Los niveles de otra proteína de iniciación de la mitofagia, BNIP3L/NIX (Figura 7D), no difirieron entre los tres grupos, lo que sugiere que esta vía no está significativamente alterada en los leucocitos de los pacientes diabéticos de tipo 2.

Además, evaluamos los niveles de mTFA (Figura 7E) y observamos un aumento marcado, pero no significativo, de la expresión de esta proteína en los pacientes diabéticos tipo 2, aumento que el tratamiento con metformina redujo significativamente ($p<0,05$). Además, con el objetivo de evaluar la biogénesis mitocondrial, analizamos PGC1 α y observamos que sus niveles estaban marcadamente disminuidos en los leucocitos de los pacientes diabéticos tipo 2 ($p<0,05$), mientras que los de los pacientes tratados con metformina mostraban un aumento significativo ($p<0,01$), como se muestra en la Figura 7F.

Además, analizamos los niveles de AMPK, un regulador clave de la energía en la célula (Figura 7G y H). Observamos una marcada disminución de los niveles proteicos de AMPK fosforilada y total en leucocitos de pacientes diabéticos de tipo 2 ($p<0,05$). Por otro lado, en los leucocitos de pacientes tratados con metformina, los niveles proteicos de AMPK fosforilada y total fueron significativamente superiores ($p<0,05$).

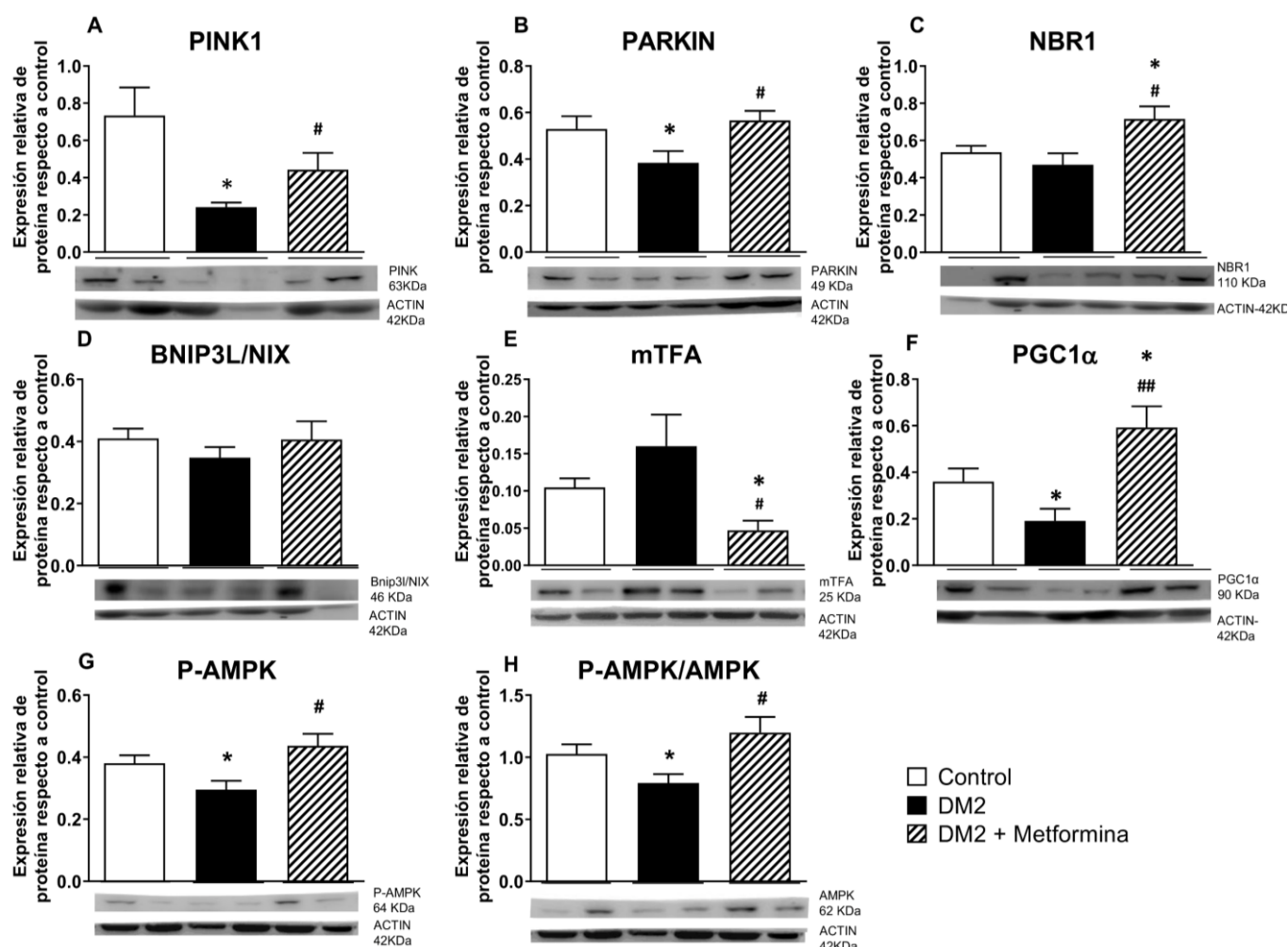
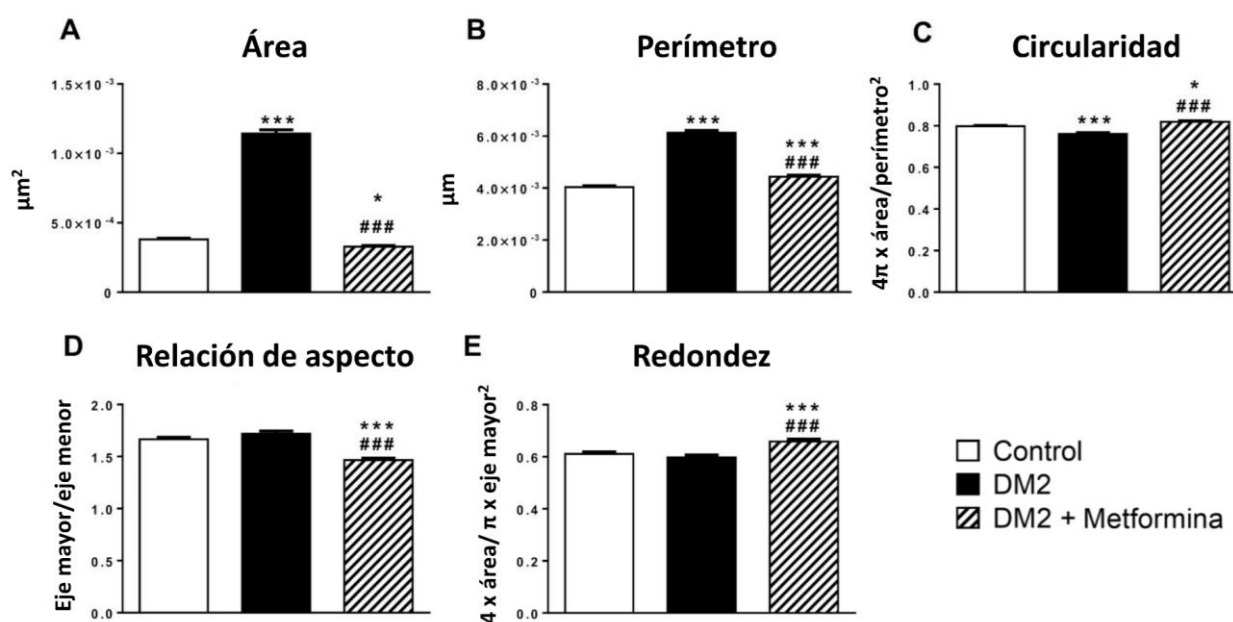


Figura 7. Niveles de expresión proteica relacionados con la mitofagia y la biogénesis mitocondrial en leucocitos de pacientes diabéticos de tipo 2 y sujetos control. Se muestran los niveles proteicos relativos a la señal de actina de las proteínas de mitofagia PINK1 (A), Parkin (B), NBR1 (C) y BNIP3L/NIX (D). También se muestran los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la biogénesis mitocondrial mTFA y PGC1α en los gráficos E y F, respectivamente. Los niveles totales y relativos de P-AMPK se muestran en los apartados G y H. Se aportan imágenes representativas de los experimentos de WB para cada proteína evaluada. Los valores de los gráficos de barras representan media±SEM. La cuantificación se realizó utilizando al menos 20 muestras para cada grupo. Las comparaciones se realizaron con ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey. * $p<0,05$ vs Control; # $p<0,05$ y ## $p<0,01$ vs diabetes tipo 2.

4.1.4 Efecto de la metformina en la morfología mitocondrial de PBMCs de pacientes con DM2

Dado que nuestros pacientes diabéticos de tipo 2 presentaban marcadores de control de calidad mitocondrial alterados, decidimos evaluar también la morfología mitocondrial mediante TEM. Observamos que los PBMCs de los diabéticos de tipo 2 presentaban mitocondrias más grandes, con mayor área (Figura 8A, $p < 0,001$) y perímetro (Figura 8B, $p < 0,001$) y menor circularidad (Figura 8C, $p < 0,001$) en comparación con los de los sujetos sanos. La redondez (Figura 8D) y la relación de aspecto, que indican la interconexión entre mitocondrias, no cambiaron significativamente entre los sujetos con diabetes tipo 2 y los controles (Figura 8E).

Por otra parte, observamos que las mitocondrias de pacientes tratados con metformina tenían un área ($p < 0,001$) y un perímetro ($p < 0,001$) menores que las de pacientes diabéticos de tipo 2 que no habían recibido metformina y sujetos sanos ($p = 0,05$ para el área, y $p < 0,001$ para el perímetro). Además, la redondez ($p < 0,001$ frente a diabetes tipo 2 y $p < 0,001$ frente a control) y la circularidad ($p < 0,001$ frente a diabetes tipo 2 y $p = 0,027$ frente a control) fueron mayores



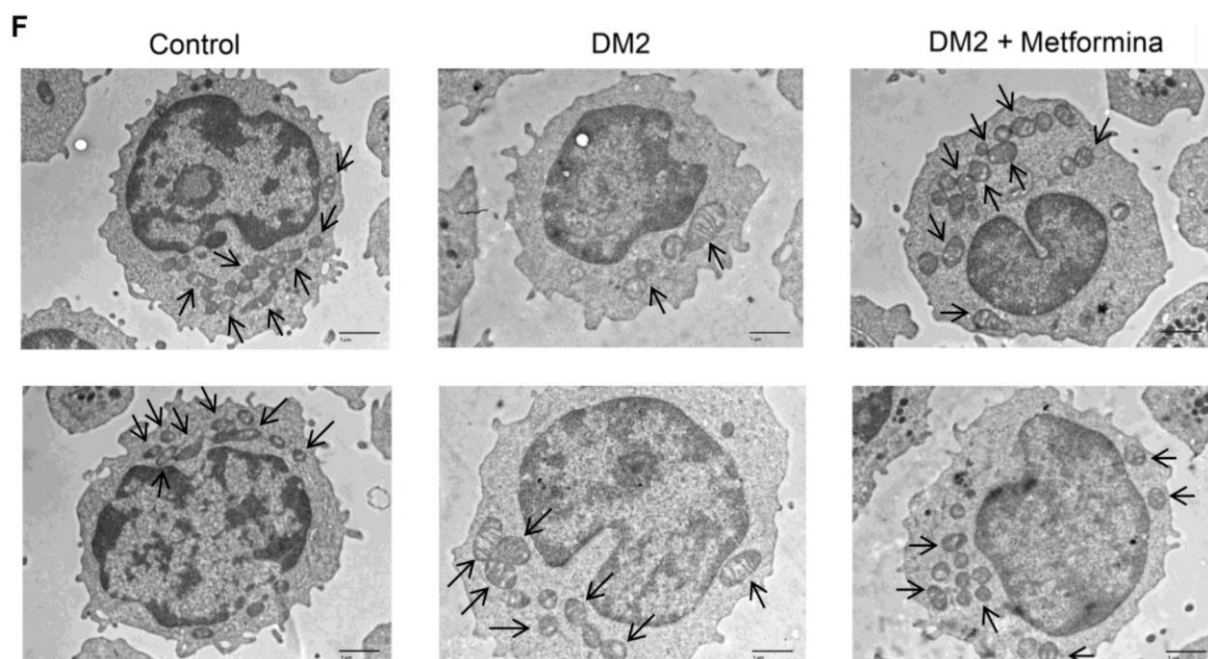


Figura 8. Análisis morfológico de mitocondrias de PBMCs de pacientes diabéticos de tipo 2 y de sujetos de control. Las imágenes TEM se analizaron con ImageJ. El área (A), el perímetro (B), la circularidad (C), la relación de aspecto (D) y la redondez (E) se midieron en al menos 100 mitocondrias de cada grupo. (F) Debajo de los gráficos se muestran imágenes representativas para cada grupo. Los valores de los gráficos de barras representan la media $\pm$ SEM. Las comparaciones se realizaron con ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey. * $p<0,05$ y *** $p<0,001$ vs Control; ### $p<0,001$ vs diabetes tipo 2.

que, en los otros dos grupos, mientras que la relación de aspecto se redujo significativamente ($p<0,001$ frente a ambos grupos). Estas características pueden observarse en las imágenes representativas (Figura 8F).

4.1.5 La metformina reduce los niveles de TNF- α e IL-6 en pacientes diabéticos tipo 2

Finalmente exploramos los niveles de las proteínas TNF- α e IL-6, marcadores del estado inflamatorio en la DM2 (Figura 9), y observamos que los niveles de ambos (Figura 9A y B) aumentaban en el suero de los pacientes diabéticos de tipo 2. En cuanto a los pacientes tratados con metformina, los niveles de TNF- α e IL-6 eran significativamente inferiores a los de los sujetos que no recibían metformina. Dado que estas citoquinas son proinflamatorias, nuestros hallazgos aportan más pruebas del papel de la inflamación en el desarrollo de la diabetes de tipo 2.

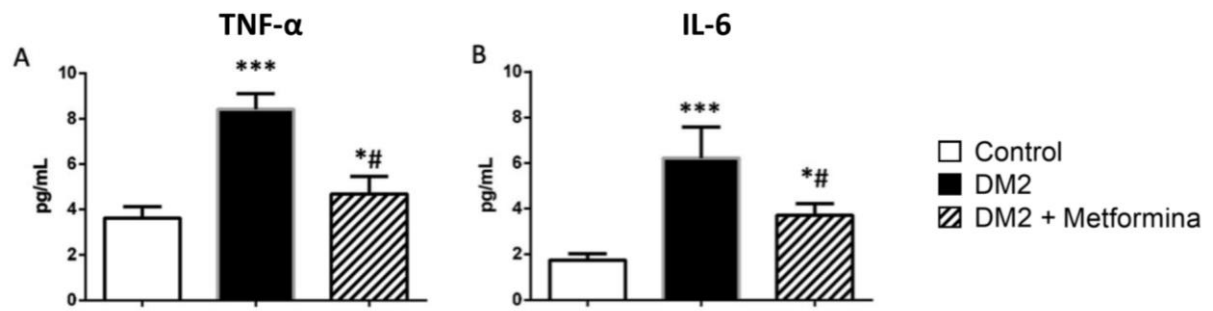


Figura 9. Niveles séricos de TNF- α (A) e IL-6 (B) medidos con un sistema analizador Luminex® 200 siguiendo el procedimiento del fabricante del Milliplex® MAP Kit. Las comparaciones se realizaron con ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ frente a Control; # $p < 0,05$ frente a DM2.

4.2 Efecto de las nanopartículas de oro/óxido de cerio sobre la interacción leucocito-endotelio, la inflamación y la autofagia en la DM2.

4.2.1 Parámetros antropométricos y bioquímicos

*Tabla 2. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los sujetos de control y de los pacientes diabéticos de tipo 2. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar para los datos paramétricos y como mediana (percentiles 25 y 75) para los datos no paramétricos. Los tres grupos se compararon con análisis de varianza de una vía (y prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls) o prueba de Kruskal-Wallis (y prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn) para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. El análisis de covarianza se realizó con un modelo lineal general univariante utilizando el IMC como covariable. * diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.*

	Control	DM2	P-valor (DM2 vs Control)	P-valor ajustado con IMC
N	57	51		
Edad (años)	53,7 $\pm$ 7,7	57,10 $\pm$ 10,3	NS	
Mujeres (%)	52	49		
Peso (kg)	72,8 $\pm$ 18,0	84,7 $\pm$ 16,4*	<0,001	-
IMC (kg/m ²)	25,7 $\pm$ 4,14	30,6 $\pm$ 5,48*	<0,001	-
Cintura (cm)	87,7 $\pm$ 12,7	103,5 $\pm$ 11,7*	<0,001	-
Glucosa (mg/dL)	94,1 $\pm$ 9,4	153,7 $\pm$ 45,0*	<0,001	<0,001
Insulina (μ L/mL)	7,19 $\pm$ 2,62	25,9 $\pm$ 15,7*	<0,001	<0,001
HOMA-IR	1,67 $\pm$ 0,70	9,74 $\pm$ 6,87*	<0,001	<0,001
HbA _{1c} (%)	5,31 $\pm$ 0,34	7,14 $\pm$ 1,16*	<0,001	<0,001
Colesterol Total (mg/dL)	203,7 $\pm$ 34,5	158,7 $\pm$ 39,1*	<0,001	<0,001
HDL (mg/dL)	57,2 $\pm$ 19,7	43,5 $\pm$ 9,85*	<0,001	<0,003
LDL (mg/dL)	126,5 $\pm$ 29,5	87,0 $\pm$ 31,7*	<0,001	<0,001
Triglicéridos (mg/dL)	90,5 (62,8–150,5)	132 (92,8–164,75) *	<0,009	NS

PCR-us (mg/L)	1,17 (0,44-2,17)	2,45 (1,22-5,39) *	<0,001	NS
---------------	------------------	--------------------	--------	----

Los pacientes con DM2 presentaban un metabolismo glucídico alterado con respecto al grupo control. Los niveles de glucosa, insulina, HOMA-IR y HbA_{1c} fueron significativamente superiores a los de los controles ($p<0,001$). Además, se observaron valores más elevados del perímetro de cintura ($p<0,001$), IMC, peso y PCR-us en el grupo de DM2 ($p<0,001$). En cuanto al perfil lipídico, nuestros pacientes con DM2 se caracterizaron por presentar un nivel más bajo de HDL ($p<0,001$) y una mayor concentración de triglicéridos ($p<0,001$). Sin embargo, debido a la presencia del tratamiento hipolipemiente con estatinas (64 % de la población diabética), los niveles de colesterol total ($p<0,001$) y LDL-c ($p<0,001$) fueron ligeramente inferiores. Cuando se recalculó la significación estadística tras ajustar el IMC, todas las diferencias entre los parámetros siguieron siendo estadísticamente significativas, excepto en el caso de los triglicéridos y la PCR-us.

4.2.2 Síntesis de las nanopartículas Oro/Óxido de Cerio

La preparación de los catalizadores de oro sobre las nanopartículas de CeO₂ mediante impregnación se llevó a cabo a través del procedimiento descrito más abajo, teniendo como resultado 4 tandas con diferente concentración de Au: 0,82, 1,79, 4,4 y 10 % en peso. Los catalizadores Au/CeO₂ se prepararon impregnando 5g de CeO₂ con una solución de 0,90 g de NaAuCl₄ en 40 mL de H₂O (miliQ). La suspensión se agitó durante 12 h a temperatura ambiente, tras lo cual se dejó evaporar todo el líquido. El sólido restante se secó a 100 °C durante 3 h, y a continuación se redujo y activó vertiéndolo en 1-feniletanol hirviendo (a 160 °C), donde se mantuvo durante 3 h. A continuación, el catalizador se filtró y se lavó consecutivamente con agua (lavados exhaustivos con agua destilada: 3 L), acetona (100 mL) y éter dietílico (50 mL) y se secó al vacío a 100 °C durante 2 h. Para los siguientes ensayos, nos centramos en las nanopartículas que contienen un 0,82 % de Au en peso para explorar sus propiedades, biocompatibilidad y efectos antiinflamatorios. La figura 10 muestra imágenes HR-TEM y STEM seleccionadas de una muestra de las nanopartículas de Au/CeO₂ 0,82 % en peso de Au. Debido al elevado peso atómico del CeO₂, es difícil visualizar los cristallitos de Au y crear un histograma preciso del tamaño de las partículas. A continuación, realizamos una microscopía electrónica de barrido de campo oscuro del catalizador AuCeO₂ al 0,82 % y un mapeo elemental mediante espectroscopía dispersiva de rayos X (EDX) (Figura 11). El mapeo elemental a nivel microscópico de este catalizador reveló una dispersión homogénea del Au sobre el soporte de CeO₂ en una muestra de 0,82 % en peso de Au/CeO₂; es decir, había una distribución similar de ambos compuestos.

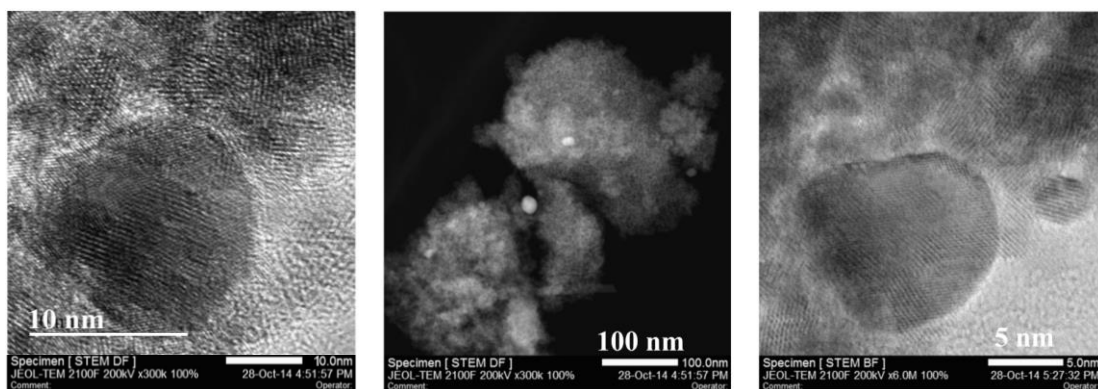


Figura 10. Imágenes representativas HR-TEM (izquierda), campo oscuro (centro) y campo claro (derecha) del catalizador 0,82 % Au/CeO₂. La imagen de alta resolución permite distinguir los planos cristalinos correspondientes a las partículas de Au. El Au está bien distribuido en las partículas, como se observa en la imagen de campo claro.

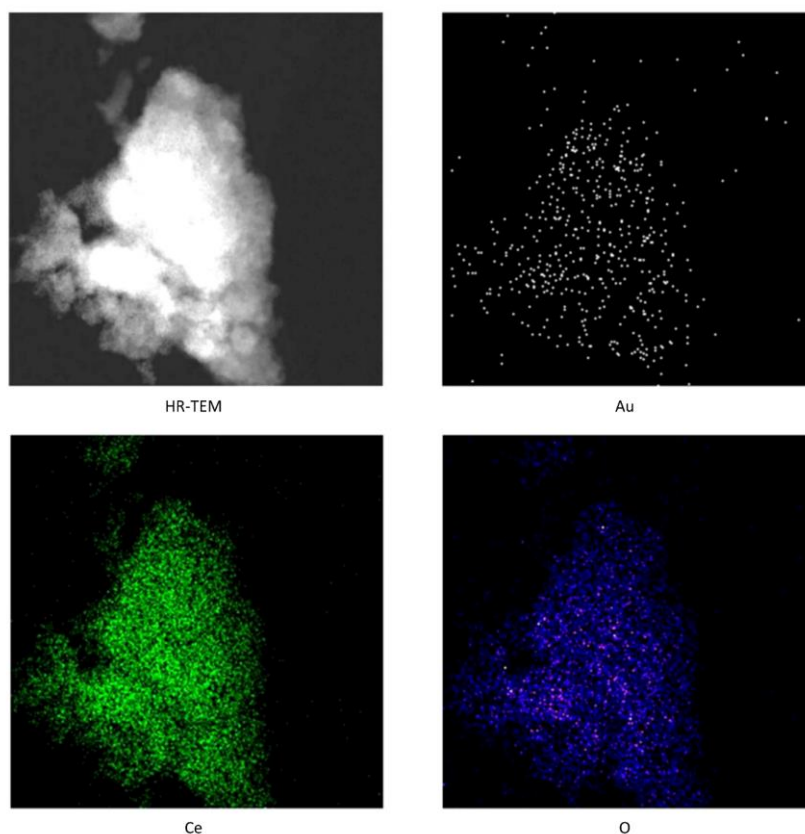


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de campo oscuro del catalizador AuCeO₂ al 0,82 % (superior izquierda) y mapeo elemental mediante EDX del oro (superior derecha), el cerio (inferior izquierda) y el oxígeno (inferior derecha). Se puede apreciar una distribución uniformemente de los distintos elementos en la formulación.

Acto seguido, realizamos nuevos análisis mediante HR-STEM con el objetivo de caracterizar el tamaño promedio de las nanopartículas con un 0,82 % de oro (Figura 12B) obteniéndose un diámetro promedio de 3,94 nm. También se analizó el tamaño promedio de las nanopartículas con un 1,79 % de oro en peso (Figura 12A) obteniéndose un valor de 6,04 nm.

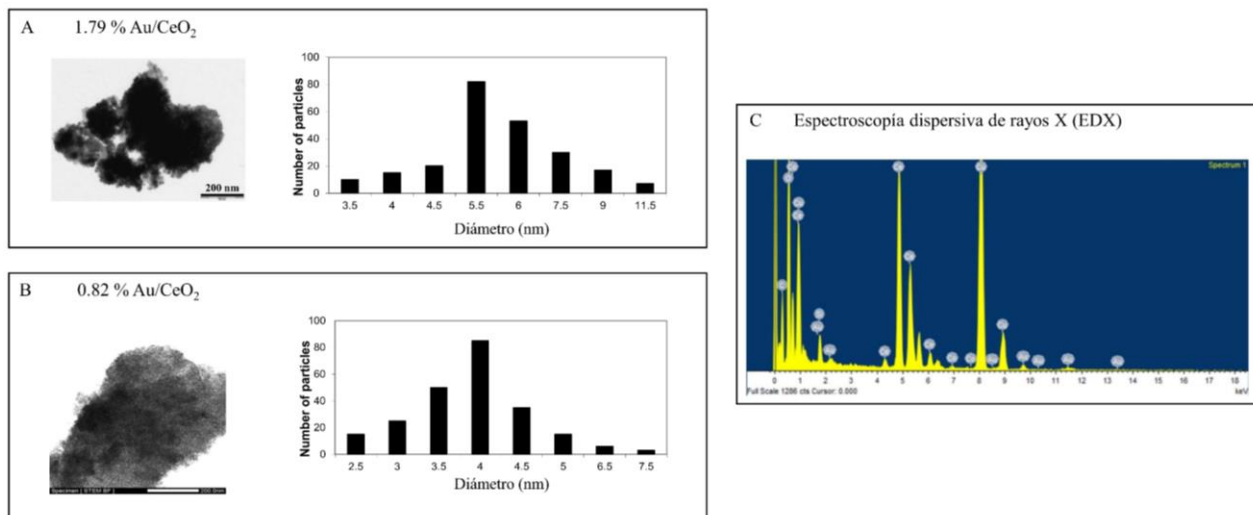


Figura 12. Análisis elemental mediante EDX e imágenes HR-STEM. (A) Histograma de tamaño de las nanopartículas de Au/CeO₂ al 1,79 % en peso, con un diámetro medio de 6,04 nm. (B) Histograma de tamaño de nanopartículas de Au/CeO₂ al 0,82 % en peso, con un diámetro medio de 3,94 nm. (C) Análisis por dispersión de energía de rayos X (EDX).

Para finalizar la caracterización de las nanopartículas realizamos un análisis mediante XPS, con el objetivo de determinar la naturaleza y estado químico de los átomos presentes en la formulación (Figura 13). En la figura 13-A se pueden observar los picos de oro del espectro XPS correspondientes a la región Au 4f en una muestra de 0,82 % en peso Au/CeO₂ y la deconvolución correspondiente, indicando la contribución de Au⁰ con una energía de enlace de 84,24 y 87.94 eV. En la figura 13B se puede apreciar la región Ce 3d XPS que muestra la contribución principalmente de Ce⁴⁺. En cuanto al apartado C de la figura 13 podemos observar los espectros O1s XPS con dos bandas diferentes, a 529.41 y 531.91 eV, asociadas a CeO y CeOH, respectivamente. Finalmente, en el apartado D de la figura 13 encontramos los espectros C1s XPS, utilizados como referencia de carga con una energía de enlace típica de 284.8 eV correspondiente al componente C-C.

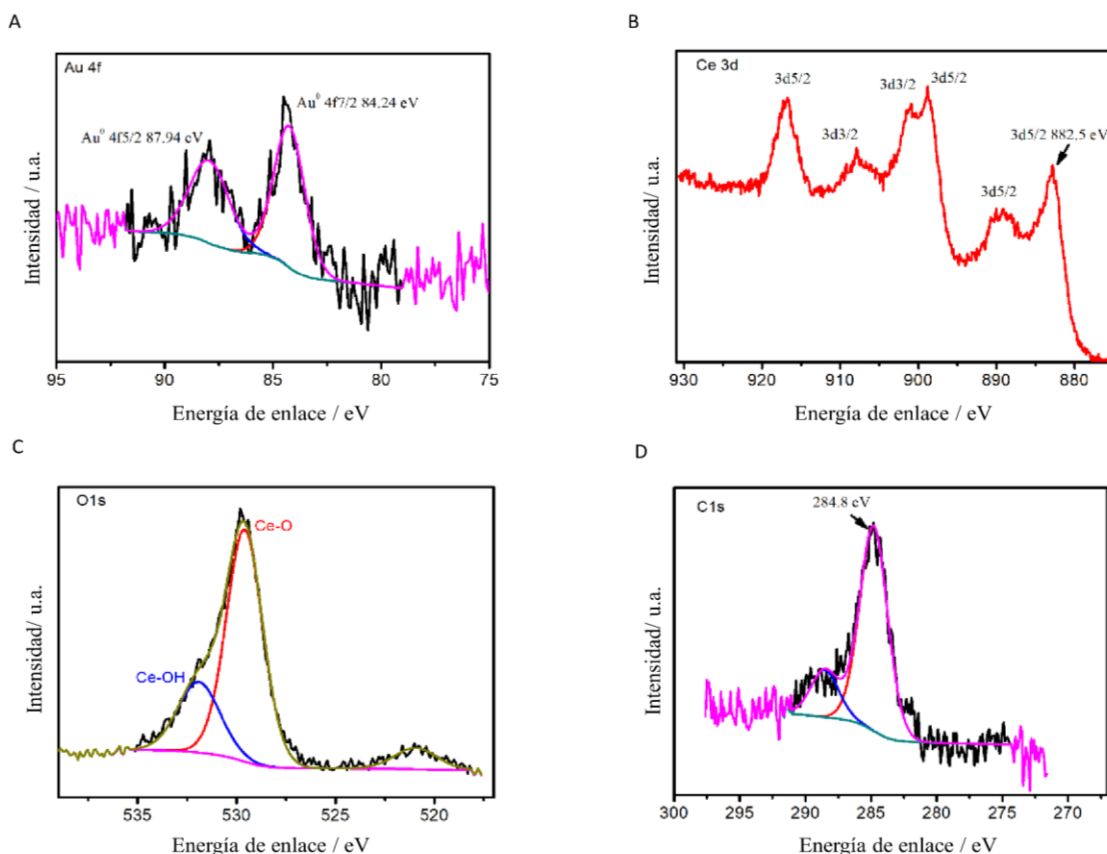


Figura 13. Espectro XPS correspondiente a las regiones Au4f (A), Ce3d (B), O1s (C) para una muestra de 0,82 % Au/CeO₂ y espectro XPS C1s (D) utilizado como control de carga.

4.2.3 Interacciones leucocito-endotelio

Es sabido que los niveles de muchos marcadores proinflamatorios aumentan en pacientes con trastornos metabólicos. Por ello, evaluamos la influencia de la DM2 y de las nanopartículas Au/CeO₂ en la interacción de los PMN con la monocapa endotelial, una de sus principales funciones. En este sentido, hemos observado una reducción de la velocidad de rodamiento de los PMN ($p < 0,001$, Figura 14 A, B, C y D), a la par que un aumento de la adhesión leucocitaria ($p < 0,05$, Figura 14 A, B, C y D) y del flujo de rodamiento ($p < 0,01$, Figura 14 A, B, C y D) en los pacientes diabéticos con respecto a los individuos control. El tratamiento con nanopartículas de CeO₂ que contenían 10, 4,4 y 1,79 % en peso de Au no modificó estos efectos (Fig 14 B, C y D). Sin embargo, el tratamiento con las nanopartículas que contenían un 0,82 % en peso de Au revirtió el efecto de la DM2 observado, aumentando la velocidad de rodamiento de los leucocitos ($p < 0,05$, Figura 14 A), disminuyendo el flujo de rodamiento ($p < 0,05$, Figura 14 A) y disminuyendo la adhesión de los leucocitos ($p < 0,05$, Figura 14 A).

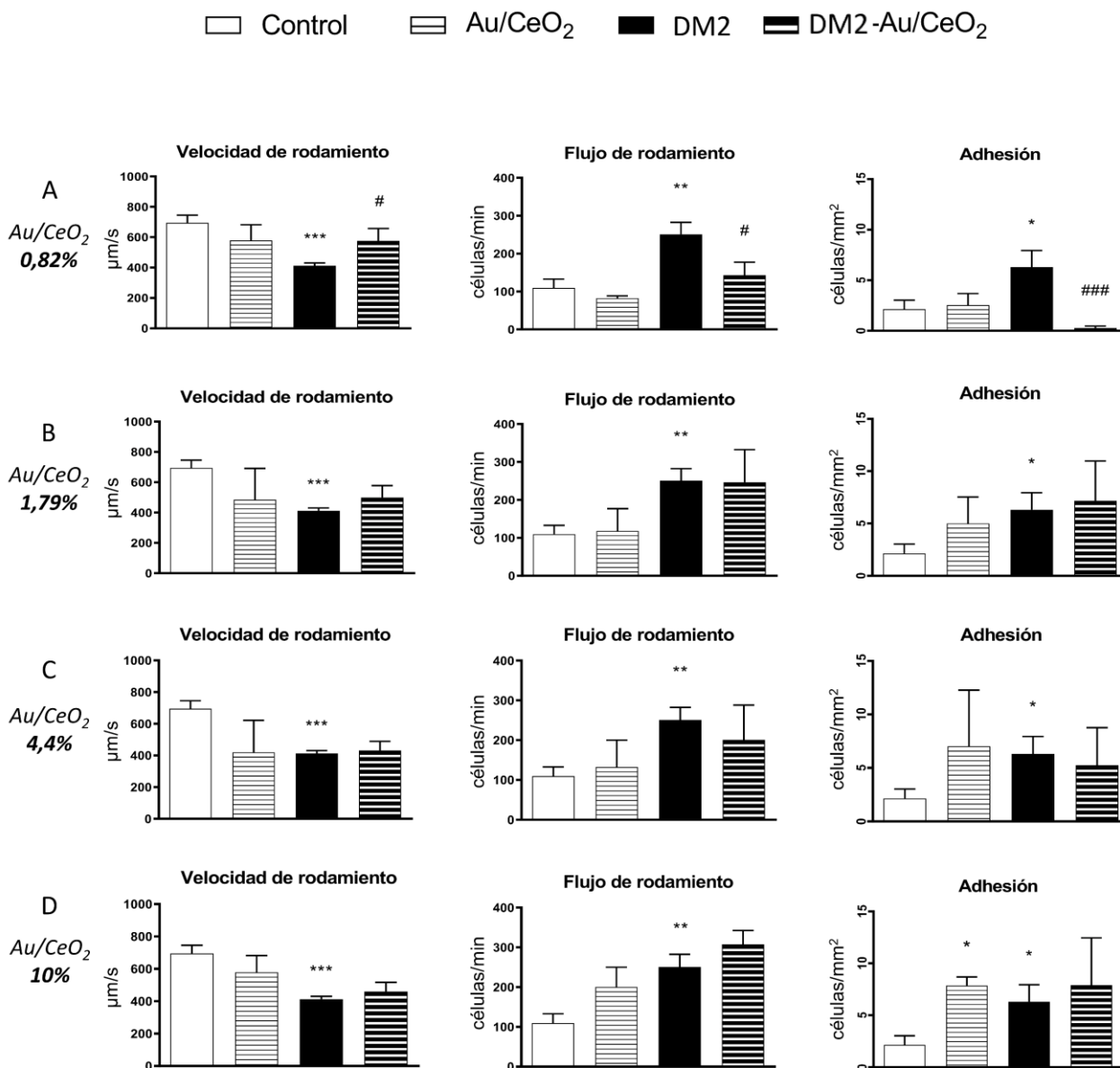


Figura 14 Evaluación de la interacción leucocito-endorrello en presencia y ausencia de Au/CeO₂ (3 h, 0,02 mg/mL) en pacientes con DM2 y sujetos control. (A-D) Nanopartículas con un 0,82 %; 1,79 %; 4,4 % y 10 % respectivamente de Au en peso. Velocidad de rodamiento (μmsegundo-1), Flujo de rodamiento (leucocitos por minuto) y Adhesión (leucocitos por milímetro cuadrado). * $p < 0,05$ vs control ** $p < 0,01$ vs control; *** $p < 0,001$ vs control. # $p < 0,05$ vs DM2; ### $p < 0,001$ vs DM2.

Por lo tanto, dado que el efecto de las Au/CeO₂ sobre la interacción leucocito-endorrello sólo se observó con 0,82 % en peso de Au, y que las nanopartículas con mayor proporción de Au (1,79, 4,4 o 10 %) carecían de efecto, realizamos los experimentos restantes con 0,82 % en peso de Au. Es sabido que la actividad catalítica del conjunto viene determinada por la presencia de Au en su formulación. Por ello, una mayor carga de Au debería aumentar el número de sitios catalíticos disponibles y, por ende, la actividad catalítica. Sin embargo, la existencia de altas

concentraciones de Au supone el aumento del tamaño medio de partícula de Au, disminuyendo así la actividad catalítica. Debido a estas características opuestas, con frecuencia se observa que la carga óptima de Au se encuentra en el rango de 0,1 a 2 % de Au en peso. En el caso que nos ocupa, parece que el rendimiento del Au a un 0,82 % en peso es mejor que el del Au con un 1,79 % en peso. También podemos especular que las nanopartículas con diferentes cantidades de Au penetran en las membranas celulares en distinta medida, modulando así su actividad biológica.

Para explorar más a fondo las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales, realizamos un ensayo de interacción estática (Figura 15). Los datos mostraron un aumento significativo de la adhesión leucocitaria cuando las HUVECs fueron estimuladas con TNF- α (5 ng/mL) ($p < 0,01$) según lo esperado. Esta condición fue usada como control positivo de adhesión. El DMSO no alteró la adhesión leucocitaria en HUVECs no estimuladas o estimuladas. Curiosamente, el tratamiento con nanopartículas de Au/CeO₂ al 0,82 % en peso (0,02 mg/mL durante 3 h) revirtió la adhesión inducida por TNF- α , dando lugar a valores similares a los de las células no estimuladas.

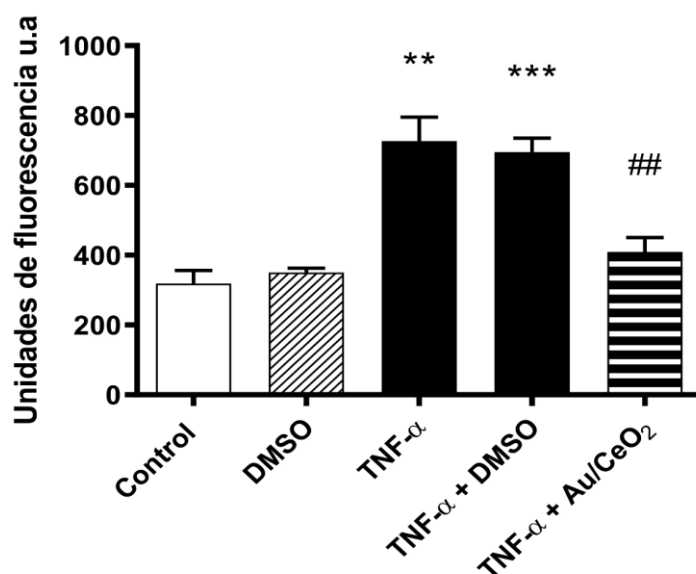


Figura 15. Efectos de Au/CeO₂ (3 h; 0,02 mg/mL) en la adhesión de leucocitos a la monocapa de HUVECs estimuladas con TNF- α (5 ng/mL). ** $p < 0,01$ vs control; *** $p < 0,001$ vs control. # $p < 0,05$ vs TNF- α ; ## $p < 0,01$ vs TNF- α .

4.2.4 Biocompatibilidad de las nanopartículas de Au/CeO₂

Al explorar los efectos de un agente antioxidante y en especial tratándose de nanopartículas metálicas, es crucial evaluar su biocompatibilidad. Para ello utilizamos la línea celular U937 (leucocitos humanos) evaluando los siguientes parámetros: (i) viabilidad celular, (ii) proliferación e (iii) inducción de apoptosis. En cuanto al ensayo de viabilidad y proliferación, las células tratadas con DMSO o 0,82 % en peso de Au/CeO₂ mostraron una tasa de multiplicación similar a la de las células no tratadas, manteniendo los mismos porcentajes de proliferación (Figura 16A). La viabilidad no se vio afectada por ninguno de los tratamientos (Figura 16B).

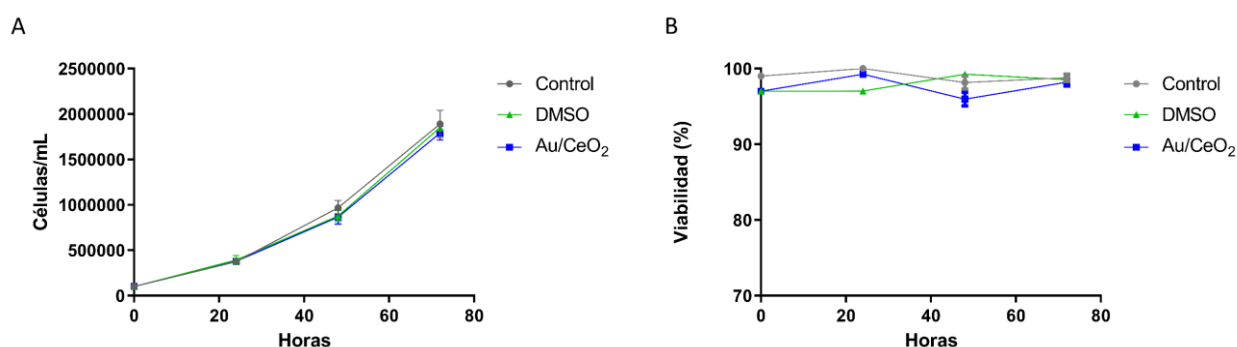


Figura 16. Determinación de la proliferación y viabilidad celular. Efecto de Au/CeO₂ y su vehículo DMSO sobre la línea celular U937. (A) El recuento celular durante 3 días no reveló diferencias en la proliferación celular entre cada condición a lo largo del experimento (72 h). (B) Viabilidad celular evaluada con doble tinción de naranja de acridina y yoduro de propidio.

Estos resultados se confirmaron estudiando específicamente la apoptosis mediante un ensayo en el que se usó AnnV y PI (Figura 17). Se evaluaron cuatro subpoblaciones celulares diferentes: Vital (AnnV⁻/PI⁻), apoptótica (AnnV⁺/PI⁻), apoptótica tardía (AnnV⁻/PI⁺) y necrótica (AnnV⁺/PI⁺) (Figura 17A). Como control positivo de apoptosis se usó STS. Casi el 85 % de las células tratadas con STS mostraron características apoptóticas en comparación con el 15 % del control negativo (células no tratadas). La porción de células apoptóticas tratadas con el vehículo (DMSO) y Au/CeO₂ fueron similares (16,2 % y 17,4 % respectivamente) (Figura 17B, C y D) y no mostraron diferencias en comparación con las células no tratadas. Estos resultados no revelaron ningún aumento en la proporción de células apoptóticas o necróticas debido al tratamiento de ninguna de las partículas analizadas.

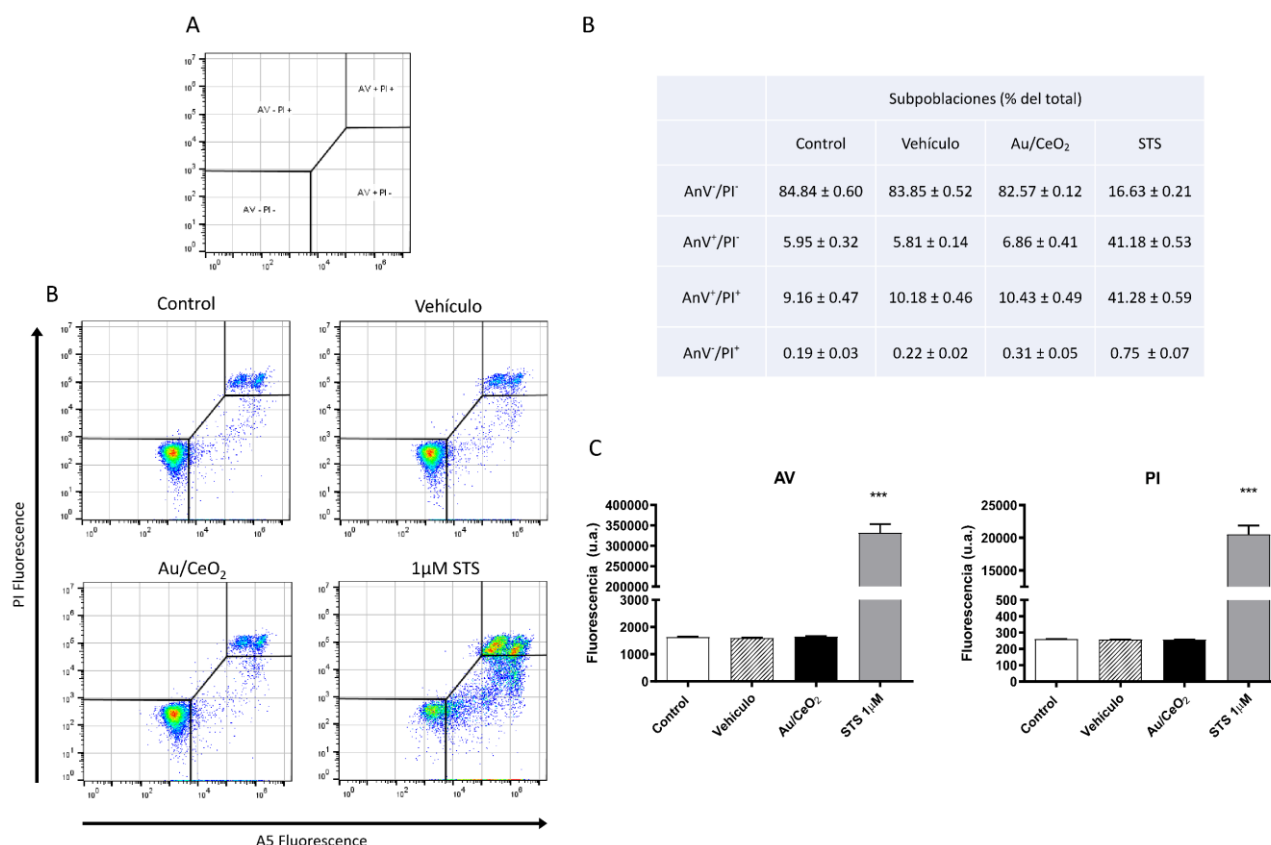


Figura 17. Evaluación de la apoptosis en células U937. (A) Diagrama representativo mostrando todas las poblaciones para cada histograma. (B) Histogramas representativos (análisis bivalente AnV/PI) de células no tratadas, vehículo (DMSO), tratamiento Au/CeO₂ y control apoptótico positivo (1 µM STS) mostrando la existencia de 4 subpoblaciones celulares: AnV⁻/PI⁻, AnV⁺/PI⁻, AnV⁻/PI⁺ y AnV⁺/PI⁺. La tabla muestra el porcentaje de cada subpoblación para cada condición estudiada (Media + SEM). (C) Resumen de los datos de fluorescencia de AnV y PI. Los datos (media + SEM) se analizaron mediante la prueba t de Student. *** $p < 0,001$ frente a control.

Por lo tanto, nuestro análisis de toxicidad celular ha revelado que las nanopartículas de Au al 0,82 % en peso no comprometen la viabilidad celular. Esto concuerda con los datos publicados anteriormente que muestran que las nanopartículas de CeO₂ soportadas por Au poseen un alto grado de biocompatibilidad en macrófagos RAW 264.7 (201).

4.2.5 Producción de ERO y niveles de NF-κB

Por otro lado, examinamos los niveles de ERO mediante fluorescencia y observamos que los leucocitos de pacientes con DM2 mostraban una mayor cantidad de ERO en comparación con los de sujetos control ($p < 0,05$) (Figura 18A). Además, el tratamiento con Au/CeO₂ conteniendo 0,82 % en peso de Au redujo significativamente los niveles de ERO ($p < 0,05$) (Figura 18A).

Como se ha mencionado anteriormente, los trastornos metabólicos producen un estado proinflamatorio general. En este sentido, examinamos la respuesta inmune celular temprana analizando la expresión proteica de NF- κ B (subunidad p65). Las HUVECs incubadas con PMN de pacientes con DM2 mostraron una mayor cantidad de p65 en comparación con las incubadas con PMN de sujetos control ($p<0,05$) (Figura 18B). Además, el tratamiento con Au/CeO₂ que contenía un 0,82 % en peso de Au moduló significativamente el aumento de la expresión de NF- κ B (p65) ($p<0,05$) (Figura 18B), lo que sugiere un efecto antiinflamatorio protector de las nanopartículas de Au/CeO₂.

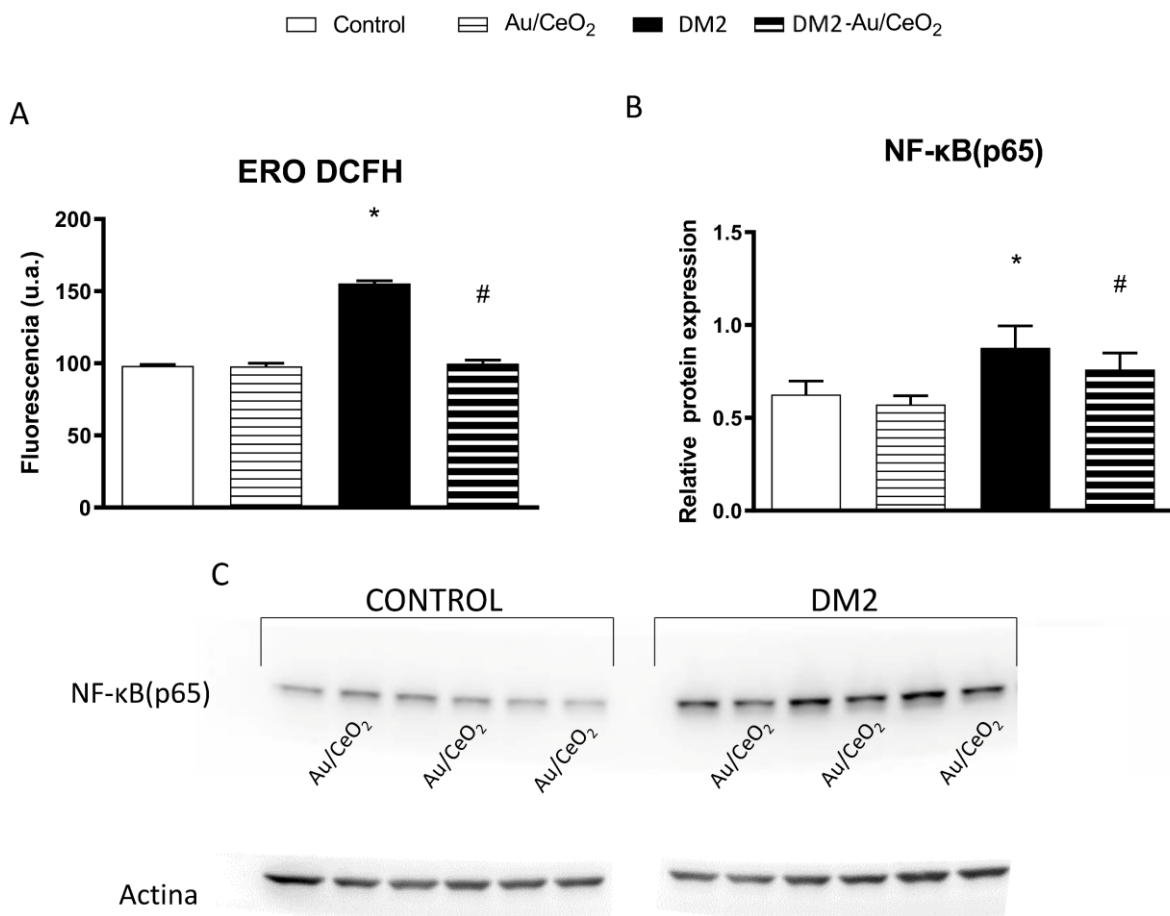


Figura 18. (A) Producción de ERO evaluada mediante DCFH-DA, (B) niveles de NF- κ B (p65) sin tratar o tratados con Au/CeO₂ (3 h, 0,02 mg/mL) en leucocitos de pacientes diabéticos de tipo 2 y sujetos control y (C) imagen representativa de WB. * $p<0,05$ vs grupo control. # $p<0,05$ vs grupo DM2.

4.2.6 Autofagia

En lo relativo al proceso autofágico, examinamos los niveles proteicos de numerosos mediadores del proceso. Encontramos que la expresión de las proteínas ATG5 (dimerizada con ATG12), ATG7 y LC3 estaba aumentada en las HUVECs que habían sido incubadas con PMNs provenientes de individuos con DM2 cuando se compararon con las HUVECs incubadas con PMNs provenientes del grupo control ($p<0,05$) (Figura 19 A-C). El tratamiento con Au/CeO₂ logró reducir significativamente los niveles de todas ellas. En la figura 19-D también se muestra la proteína LAMP2, relacionada con la fusión del autofagosoma y el lisosoma. Encontramos una tendencia al alza no significativa al comparar grupo control con el grupo diabético, mientras que el tratamiento con Au/CeO₂ mostró una tendencia de nuevo no significativa a reducir los niveles de expresión.

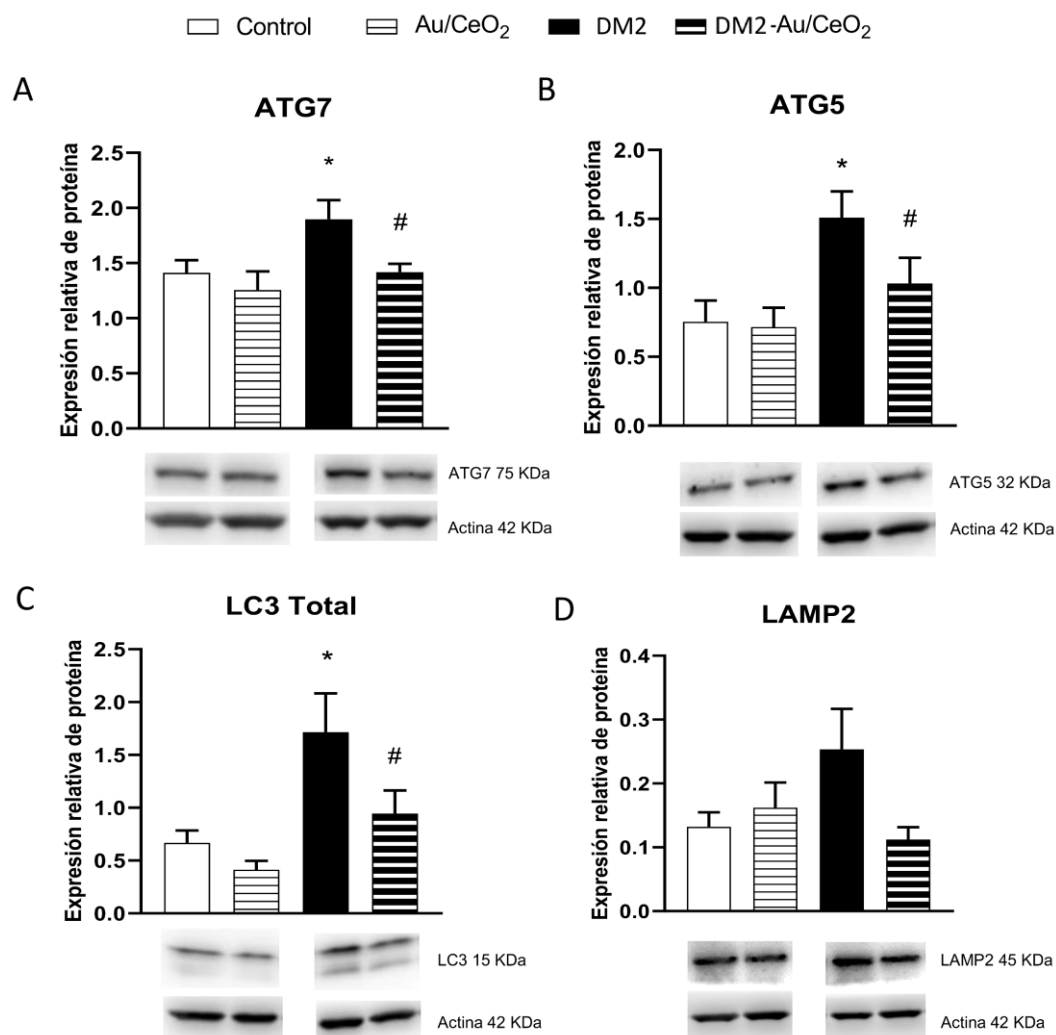


Figura 19. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la autofagia (A-ATG7, B-ATG5, C-LC3 y D-LAMP2) e imágenes representativas de WB. * $p<0,05$ vs grupo control. # $p<0,05$ vs grupo DM2.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial y la mitofagia en PBMCs de pacientes con DM2

La metformina es una biguanida utilizada como tratamiento de primera línea contra la DM2 (202). Numerosos estudios previos han demostrado los beneficios de la metformina en diferentes parámetros, como los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR (202,203). En el presente estudio, la cohorte de pacientes diabéticos de tipo 2 mostró alteraciones típicas en los parámetros clínicos con respecto a los controles; concretamente un aumento en el IMC, el perímetro de cintura, el índice cintura-cadera, la presión arterial sistólica, la insulina, el HOMA-IR y la glucosa. El tratamiento con metformina redujo los niveles de glucosa y la HbA_{1c}, en consonancia con estudios previos (204). En cuanto a los parámetros lipídicos, los pacientes diabéticos de tipo 2 mostraron un aumento de los niveles de VLDL y triglicéridos, pero una reducción de los niveles de colesterol, HDL y LDL. Estos resultados concuerdan con evidencias previas que demuestran que este efecto es consecuencia del tratamiento hipolipemiante en estos pacientes y es independiente de la existencia o no de tratamiento con metformina (202).

Además de las alteraciones bioquímicas descritas, observamos un aumento de ERO mitocondriales, lo que refleja los hallazgos de investigaciones previas (203,205). En este sentido, es importante destacar que, aunque las ERO pueden actuar como moléculas de señalización celular, la presencia de niveles excesivos son una señal de estrés celular y pueden conducir a la activación de vías inflamatorias y daño endotelial. Como se ha comentado anteriormente, la DM2 también cursa con disfunción mitocondrial, asociada a condiciones de hiperglucemia e hiperlipidemia crónicas (206). De especial importancia es también el papel de la disfunción mitocondrial en el desarrollo de resistencia a la insulina (207,208). Por lo tanto, evaluamos los posibles efectos beneficiosos de la metformina explorando su capacidad hipoglucemiante y, su posible efecto sobre la disfunción mitocondrial. Como era de esperar, la metformina demostró tales efectos beneficiosos en pacientes diabéticos de tipo 2 a la par que demostró capacidad para disminuir las ERO mitocondriales.

La DM2 también se ha relacionado con una alteración de los complejos mitocondriales. De hecho, se han descrito anomalías mitocondriales en el músculo esquelético de las extremidades posteriores de ratones diabéticos alimentados con dietas ricas en grasas, como la disminución de la respiración estimulada por ADP, la actividad de los complejos I y III de la ETC y la densidad mitocondrial (209). Otro estudio demostró que la actividad y los niveles de

expresión de los complejos I y IV de la ETC estaban disminuidos en las mitocondrias del tejido auricular derecho de pacientes diabéticos de tipo 2 (210). En esta parte de la tesis, hemos demostrado que la expresión de VDAC no cambió, pero sí encontramos que los niveles de los complejos I, II, III y IV disminuyeron en la DM2, estableciendo así una relación entre la DM2 y la alteración mitocondrial. Además, estos efectos fueron revertidos por la metformina, mostrando así una acción beneficiosa sobre la función mitocondrial. Por otro lado, se ha observado que la metformina puede activar el regulador AMPK en los hepatocitos y el músculo esquelético, provocando la disminución de la producción de glucosa por el hígado y el aumento de los niveles de glucosa en el músculo esquelético (211). También, se ha demostrado que la metformina aumenta la expresión de GLUT4 en el músculo sóleo de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ) (212); y en este sentido, se ha demostrado que el tratamiento con metformina en ratones diabéticos inducidos por STZ atenúa la aterosclerosis al disminuir la fisión mitocondrial endotelial y las ERO mitocondriales (213).

En condiciones fisiológicas, unos niveles adecuados de ERO señalizan y facilitan la activación de diferentes mecanismos de defensa celular, como la regulación al alza de los antioxidantes y la autofagia, para proteger a la célula de las lesiones mediadas por el estrés oxidativo. Sin embargo, cuando los niveles de ERO son elevados, un desequilibrio en la producción de ERO da lugar a la acumulación de mitocondrias disfuncionales dentro de la célula, comprometiendo así su viabilidad y funcionalidad (214). Además, el aumento de la generación de ERO conduce a la acumulación de mutaciones del ADN mitocondrial, lo que promueve la formación y agregación de mitocondrias "resistentes a la mitofagia" (215). En este sentido, se ha demostrado que la presencia de mitocondrias disfuncionales está relacionada con la disminución de la sensibilidad a la insulina y el deterioro de la síntesis y secreción de insulina de las células β pancreáticas, lo que a su vez contribuye a la progresión a DM2 (216). En esta parte del estudio, hemos demostrado una disminución de los niveles de proteínas PINK1 y Parkin en la DM2, lo que apunta a una alteración de la mitofagia, aunque no se encontraron cambios en NBR1, BNIP3/NIX y mTFA. De acuerdo con estos datos, se ha observado una regulación a la baja significativa de los transcritos de PINK1 en biopsias de músculo esquelético obtenidas de pacientes diabéticos de tipo 2 (217), y se ha informado de una expresión reducida de ARNm de mitofusina 2 (MFN2), Parkin y PINK1 en pacientes con nefropatía diabética (218).

También observamos una disminución de PGC1 α y AMPK-P en pacientes con DM2, proteínas con funciones clave en el metabolismo oxidativo y la biogénesis mitocondrial. Una disminución similar se ha observado en el vasto lateral de pacientes con DM2 en comparación con controles sin historia familiar de diabetes mellitus (219). Es importante destacar que una

disminución en la expresión de genes relacionados con PGC1 α implica una disminución en la oxidación de ácidos grasos, la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y los genes de la ETC (219). Es de destacar que la metformina revirtió la regulación a la baja de PGC1 α en nuestros pacientes, en consonancia con el estudio de Aatsinki *et al.* (220), donde demostraron que la metformina induce la expresión de PGC1 α y afecta selectivamente a las funciones PGC1 α hepáticas, y con el de Suwa *et al.* (217), donde se demostró *in vivo* que la metformina aumenta los niveles de proteína PGC1 α y la actividad enzimática oxidativa, posiblemente a través de la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético.

Por otro lado, hallamos alteraciones significativas al estudiar la calidad mitocondrial en la DM2 mediante análisis TEM. Los leucocitos de nuestros pacientes diabéticos de tipo 2 presentaban alteraciones mitocondriales, como mayor tamaño, aumento del área y del perímetro y reducción de la circularidad. Estos resultados podrían parecer contradictorios con los comunicados previamente en DM2, que apoyan un aumento de la fisión mitocondrial (203). Sin embargo, el aumento del tamaño mitocondrial puede explicarse por la formación de megamitocondrias, mitocondrias hinchadas que se generan debido a una disfunción de la actividad mitocondrial, y que no se procesan por el mecanismo de fisión tradicional (221,222). Estas mitocondrias alteradas se han descrito previamente en células β pancreáticas de ratas con DM2 y también en podocitos de modelos murinos e *in vitro* de DM2 (223,224). Por lo tanto, un aumento de la fusión podría coexistir con la presencia de megamitocondrias, reforzando que la disfunción mitocondrial es una característica de los leucocitos afectados por la DM2. Se necesitan más estudios para precisar exactamente las alteraciones en las mitocondrias presentes en los leucocitos de los pacientes diabéticos de tipo 2. En cambio, las mitocondrias de los pacientes tratados con metformina no presentaban esta morfología alterada, sino que tenían un área y un perímetro menores que las de los pacientes no tratados y los sujetos sanos. Estos resultados concuerdan con los de Wang *et al.* (225), quienes demostraron que la metformina mejora la actividad respiratoria mitocondrial a través de la activación de la AMPK y preserva la estructura mitocondrial en hepatocitos de ratones alimentados con dieta rica en grasas.

Por último, también encontramos que los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 fueron significativamente superiores en pacientes con DM2. Sin embargo, este aumento fue revertido tras el tratamiento con metformina. Existen evidencias de que la excesiva liberación de TNF- α tras la activación leucocitaria por estrés oxidativo puede inhibir la señalización y liberación de insulina a la par que altera la absorción de glucosa (226). Estos resultados van en concordancia con los reportados por Amoani *et al.* (227) que demostraron como la metformina es capaz de reducir significativamente los niveles de varias citoquinas

proinflamatorias en circulación sistémica de pacientes con DM2. Con ello, nuestros resultados aportan más evidencias del papel que juegan estas citoquinas en el desarrollo de DM2 y cómo la metformina puede ayudar a modularlos.

5.2 Efecto de las nanopartículas de oro/óxido de cerio sobre la interacción leucocito-endotelio, la inflamación y la autofagia en la DM2

El uso de nanopartículas con fines terapéuticos es un enfoque eficaz y en rápida expansión para crear nuevas formulaciones destinadas a tratar diversas enfermedades humanas, entre ellas la DM2. En las aplicaciones biomédicas, las nanopartículas de oro se encuentran entre las nanopartículas más prometedoras (192).

Aunque la etiología de la resistencia a la insulina y la DM2 es intrincada, diferentes estudios han constatado que las ERO pueden inducir estrés oxidativo y, por tanto, exacerbar la resistencia a la insulina (196,197), lo que pone de manifiesto el potencial terapéutico de los antioxidantes. En este sentido, existen abundantes evidencias, tanto *in vitro* como *in vivo*, que apoyan el potencial de las nanopartículas de oro como antioxidantes (198) en modelos de DM2 (199), entre otros. Por otro lado, también se ha propuesto una capacidad similar de eliminación de ERO para otros elementos metálicos, como el CeO₂ (228). En la presente tesis, hemos utilizado una combinación de nanopartículas de oro soportadas sobre nanopartículas de CeO₂ (Au/CeO₂) debido a su ya conocida acción antioxidante (191). En este mismo estudio las nanopartículas de Au/CeO₂ demostraron tener mejor actividad de eliminación de ERO, mayor biocompatibilidad y actividad peroxidasa que las nanopartículas de CeO₂ "simples". Sin embargo, hasta ahora no se había abordado el efecto beneficioso de las nanopartículas de oro depositadas sobre CeO₂ en el contexto de la DM2. Por ello, en esta parte de la tesis doctoral nos centramos en describir la generación de nanopartículas de Au/CeO₂ y evaluamos sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en el contexto de la DM2 mediante un enfoque *in vitro*.

El proceso de síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo en el Instituto de Tecnología Química (ITQ) de la Universidad Politécnica de Valencia en el grupo del profesor Hermenegildo García. Para asegurar una calidad adecuada del producto, se realizaron ensayos HR-TEM, EDX y XPS donde se observó que las nanopartículas tenían una distribución homogénea del oro sobre el CeO₂, un porcentaje de oro igual al deseado y la naturaleza y estado químico de los átomos presentes en la formulación eran los correctos.

La cohorte de pacientes seleccionados para este estudio mostró rasgos característicos de la población diabética de tipo 2 con el metabolismo hidrocarbonado y lipídico alterados en comparación con la población control. Una vez más, el tratamiento hipolipemiente con estatinas resultó en niveles inferiores de LDL, HDL y colesterol total en la población diabética tipo 2. Cabe destacar también, que las diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones en los parámetros de PCR-us y triglicéridos desaparecieron tras ajustar por IMC.

En lo relativo al efecto de las nanopartículas de oro-óxido de cerio sólo se observó un efecto sobre la interacción leucocito-endotelio cuando la formulación contaba con un porcentaje de oro del 0,82 % en peso, mientras que las nanopartículas con un mayor porcentaje de oro (1,79, 4,4 o 10,8 %) carecían de efecto. Las razones que explican esta falta de efecto no están claras, pero podemos especular que las nanopartículas con diferentes cantidades de Au penetran en las membranas celulares en distinta medida, afectando así a su actividad biológica. Otra posible explicación es que la presencia de grandes cantidades de oro puede alterar la capacidad del CeO₂ de ofrecer una sustentación adecuada que optimice las propiedades óxido-reductoras del conjunto, afectando así a su actividad catalítica.

Es importante destacar que los estudios de toxicidad celular han revelado que las nanopartículas de Au al 0,82 % en peso no comprometen la viabilidad celular. Esto concuerda con los datos publicados anteriormente que muestran que las nanopartículas de Au soportadas por CeO₂ poseen un alto grado de biocompatibilidad con los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 (201). Podrían proponerse múltiples dianas que estén implicadas en los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de las nanopartículas Au/CeO₂ sobre el sistema leucocito-endotelio. Por ejemplo, se ha descrito que las nanopartículas de CeO₂ reducen la producción de ERO y los niveles de la proteína iNOS en macrófagos estimulados (180), o que disminuyen los niveles de ARNm de varios marcadores inflamatorios, como la IL-8, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) en células endoteliales aórticas humanas (HAECs) (229). En este sentido, las ERO pueden desempeñar un papel clave en el deterioro endotelial mediado por la hiperglucemia y en las complicaciones vasculares asociadas a la resistencia a la insulina y a la DM2 (230,231). De hecho, se ha demostrado que los pacientes con DM2 tienen un mayor riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares, lo que probablemente esté relacionado con la producción mitocondrial de ERO y el estrés oxidativo (232). En este contexto, los resultados del presente estudio confirman que el tratamiento con Au/CeO₂ al 0,82 % reduce los niveles de ERO, lo que apunta a un efecto antioxidante beneficioso en la DM2.

En cuanto a los potenciales efectos antiinflamatorios de las nanopartículas oro-óxido de cerio, hay que tener en cuenta que la DM2 está estrechamente relacionada con la inflamación y con las citoquinas proinflamatorias (233). Como ya hemos comentado, existe en los pacientes con DM2 un estado de inflamación crónica de bajo grado, siendo NF- κ B uno de los principales responsables de este estado. En presencia de determinadas citoquinas proinflamatorias (principalmente TNF- α) se produce la activación de la quinasa IKK, que fosforila a los inhibidores I κ B y permite la activación de NF- κ B. De hecho, se ha demostrado que NF- κ B se encuentra elevado en leucocitos de pacientes diabéticos tipo 2 resaltando la importancia de este factor de transcripción (234) en la respuesta inflamatoria leucocitaria en la DM2. En línea con estos datos, nuestros experimentos han señalado que las HUVECs en presencia de leucocitos de pacientes con DM2 aumentaban también la expresión de NF- κ B. Además, encontramos que el tratamiento con nanopartículas de Au/CeO₂ 0,82% previno el aumento de NF- κ B sugiriendo un papel antiinflamatorio de estas nanopartículas en la DM2. En este sentido, se ha demostrado que otros compuestos antioxidantes, como MitoQ o MitoTempol, pueden proteger a los leucocitos y a las células β pancreáticas frente al estrés oxidativo disminuyendo la actividad de NF- κ B y promoviendo su supervivencia en la DM2 (235).

Respectivo a la autofagia, su estado de activación o inhibición es muy dependiente del estado metabólico y tipo celular, más si cabe en presencia de una enfermedad metabólica como lo es la DM2. En cualquier caso, es indudable que la desregulación del proceso autofágico es uno de los actores principales en la fisiopatología de la DM2 (151). En este estudio, quisimos analizar el estado de la autofagia en las HUVECs que habían sido estimuladas por PMN de individuos con DM2. Por un lado, encontramos que la expresión de la proteína ATG5 (dimerizada con ATG12) se encontraba elevada en las células endoteliales tras su estímulo con PMN de pacientes diabéticos, elevación no presente en HUVECs que estuvieron en contacto con PMN de individuos sanos. Esto supone un posible aumento en la actividad del sistema de conjugación ATG12, estrechamente relacionado con la formación del fagóforo debido a su implicación en el reclutamiento e inserción del sistema de conjugación LC3/GABARAPs a la doble membrana (236). Por otro lado, también observamos un aumento en la cantidad de LC3 total, siendo este la suma de su forma completa, de la proteína resultante tras la escisión proteolítica mediada por ATG4 y de su forma conjugada a PE. Esto también nos estaría reflejando un probable aumento en el sistema de conjugación LC3/GABARAPs, siendo este uno de los principales marcadores de activación autofágica, ya que se mantiene en la doble membrana del fagóforo, autofagosoma y autolisosoma durante todo el proceso de la autofagia. Finalmente, también encontramos un aumento en los niveles de expresión de la proteína ATG7 en las células endoteliales activadas

con PMN de pacientes diabéticos en comparación con sus homólogas control. Este aumento se encuentra en línea con el aumento de las proteínas ATG5-ATG12 y LC3 de los sistemas de conjugación ATG12 y LC3/GABARAPs ya que ATG7 es partícipe del ensamblado de ambos. En el sistema de conjugación ATG12, ATG7 cataliza la reacción de adenilación de LC3-I activándola antes de su transferencia a ATG3 para mediar su unión con PE. Por otro lado, ATG7 activa a ATG12 en el proceso de dimerización con ATG5, también importante en el mecanismo de lipidación de LC3 (237).

No existe un consenso en lo que respecta al papel de la autofagia en las células endoteliales y su relación con la inflamación. Algunos estudios sugieren que la autofagia tiene un papel proinflamatorio mientras que otros estudios mantienen que tiene un papel antiinflamatorio. Por ejemplo, en un modelo de inflamación inducida por trombina en células endoteliales deficientes en ATG7 se observó que las células endoteliales presentaron menor actividad del factor NF- κ B, lo que resultó en un menor estado inflamatorio representado por menores niveles de IL-6 y MCP-1 (238).

En general, nuestros hallazgos permiten una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que se producen en los pacientes con DM2, especialmente para las interacciones leucocito-endotelio. Estos datos sugieren que el estrés oxidativo, la sobreactivación de los mecanismos proinflamatorios junto con la desregulación de la autofagia, contribuyen a potenciar las interacciones entre estas células, lo que a su vez aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Los PBMCs de pacientes con DM2 muestran menores niveles de expresión proteica en los complejos I, II, III y V de la ETC a la par que presentaban mayores niveles de ERO mitocondriales cuando se compararon con leucocitos de pacientes control. En cuanto a la mitofagia, observamos una disminución en los marcadores PINK1 y PARKIN, así como una disminución en los marcadores de biogénesis mitocondrial PGC1 α y AMPK. Así pues, se postula que el tratamiento con metformina tiene un efecto beneficioso sobre la función mitocondrial ya que es capaz de aumentar considerablemente la expresión de los complejos de la ETC, de las proteínas de mitofagia PINK1 y PARKIN y de las proteínas de biogénesis mitocondrial PGC1 α y AMPK a la par que disminuye los niveles de ERO mitocondriales.
2. Las mitocondrias de los PBMCs de pacientes con DM2 presentan un aumento en su área y perímetro mientras que su circularidad es menor que las mitocondrias de individuos control. Estos efectos sobre la morfología son revertidos tras el tratamiento de metformina. Por ello la alteración de la morfología mitocondrial observada en la DM2 es revertida mediante el tratamiento con metformina. Paralelamente, el aumento de expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6 en suero de pacientes con DM2 también es reducido por el tratamiento con metformina.
3. Tras ensayar 4 concentraciones de oro en el soporte de CeO₂ (0,82; 1,79; 4,4 y 10 % en peso) concluimos que las únicas nanopartículas capaces de revertir las alteraciones leucocito-endotelio observadas en la DM2 son aquellas que cuentan con un menor porcentaje de oro (0,82 %). La caracterización experimental nos revela una distribución homogénea del oro, un tamaño medio de partícula de 3,94 nm y unas propiedades fisicoquímicas acordes a las esperadas para esta formulación.
4. Las nanopartículas Au/CeO₂ 0.82 % son capaces de reducir el exceso de producción de ERO mitocondriales observado en PMNs de pacientes con DM2 a la par que reducen la sobreexpresión de NF- κ B que estos inducen en células endoteliales. Además, el tratamiento con Au/CeO₂ 0.82 % parece revertir las alteraciones causadas en la autofagia de las células endoteliales en contacto con PMNs de individuos con DM2. Todo ello mostrando elevada biocompatibilidad en modelos *in vitro*.

CONCLUSIONS

1. PBMCs from patients with T2D exhibit lower levels of protein expression in ETC complexes I, II, III and V and higher levels of mitochondrial ROS when compared to PBMCs from control patients. Regarding mitophagy, we observed a decrease in PINK1 and PARKIN markers, as well as a decrease in the mitochondrial biogenesis markers PGC1 α and AMPK. Thus, we believe that metformin treatment has a beneficial effect on mitochondrial function due to the fact that it significantly increases the expression of ETC complexes, mitophagy proteins PINK1 and PARKIN and the mitochondrial biogenesis proteins PGC1 α and AMPK while decreasing mitochondrial ROS levels.
2. Mitochondria from PBMCs of T2D patients present an increase in their area and perimeter and a decrease in their circularity when compared with mitochondria from controls. These effects on mitochondrial morphology are reversed after metformin treatment. Thus, the alteration of mitochondrial morphology observed in T2D is ameliorated by metformin. In parallel, increased expression of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in the serum of patients with T2D is also reduced by metformin.
3. After testing 4 gold concentrations on the CeO₂ support (0.82; 1.79; 4.4 and 10 wt. %) we can conclude that the only nanoparticles capable of reversing the leukocyte-endothelium alterations observed in T2D are those with the lowest percentage of gold (0.82 %). Experimental characterization revealed a homogeneous distribution of gold, an average particle size of 3.94 nm and physicochemical properties in accordance with those expected of this formulation.
4. Au/CeO₂ nanoparticles 0.82 % can reduce the excess production of mitochondrial ROS observed in PMNs from T2D patients while reducing the overexpression of NF- κ B in endothelial cells. Furthermore, treatment with Au/CeO₂ 0.82 % appears to reverse alterations in the autophagy of endothelial cells in contact with PMNs from individuals with T2D. Additionally, they show high biocompatibility in *in vitro* models.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*. 16 de diciembre de 2021;45(Supplement_1):S17-38.
2. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*. 16 de diciembre de 2021;45(Supplement_1):S83-96.
3. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. junio de 2017;389(10085):2239-51.
4. Nathan DM, Turgeon H, Regan S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia*. noviembre de 2007;50(11):2239-44.
5. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. enero de 2022;183:109119.
6. Freychet L, Rizkalla SW, Desplanque N, Basdevant A, Zirinis P, Tchobroutsky G, et al. Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 18 de junio de 1988;1(8599):1364-6.
7. Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J Diabetes Investig*. 27 de noviembre de 2013;4(6):511-6.
8. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. noviembre de 2002;45(11):1475-83.
9. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 13 de diciembre de 2001;414(6865):799-806.

10. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2018;19(1):31-44.
11. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 20 de abril de 2017;169(3):381-405.
12. Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul.* agosto de 2017;65:5-15.
13. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* septiembre de 1999;19(9):6286-96.
14. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* octubre de 2012;55(10):2565-82.
15. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem.* mayo de 1998;182(1-2):91-9.
16. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 23 de 2015;1:15019.
17. Carnagarin R, Dharmarajan AM, Dass CR. Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle--A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 5 de diciembre de 2015;417:52-62.
18. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2 de marzo de 2012;148(5):852-71.
19. Matsuda M, DeFronzo RA, Glass L, Consoli A, Giordano M, Bressler P, et al. Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2

- diabetic patients and normal individuals. *Metabolism*. septiembre de 2002;51(9):1111-9.
20. Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*. febrero de 2001;24(2):382-91.
 21. Barrett EJ, Wang H, Upchurch CT, Liu Z. Insulin regulates its own delivery to skeletal muscle by feed-forward actions on the vasculature. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. agosto de 2011;301(2):E252-263.
 22. DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*. octubre de 2004;(143):9-21.
 23. Gurgul-Convey E, Mehmeti I, Plötz T, Jörns A, Lenzen S. Sensitivity profile of the human EndoC- β H1 beta cell line to proinflammatory cytokines. *Diabetologia*. octubre de 2016;59(10):2125-33.
 24. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J*. 15 de diciembre de 2016;473(24):4527-50.
 25. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*. septiembre de 2003;144(9):4154-63.
 26. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. enero de 2003;52(1):102-10.
 27. Ferrannini E, Mari A. β -Cell function in type 2 diabetes. *Metabolism*. octubre de 2014;63(10):1217-27.

28. Ferrannini E. The stunned beta cell: a brief history. *Cell Metab.* 5 de mayo de 2010;11(5):349-52.
29. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* junio de 2012;35(6):1364-79.
30. Pozzilli P, Leslie RD, Chan J, De Fronzo R, Monnier L, Raz I, et al. The A1C and ABCD of glycaemia management in type 2 diabetes: a physician's personalized approach. *Diabetes Metab Res Rev.* mayo de 2010;26(4):239-44.
31. Nakagami T, Kawahara R, Hori S, Omori Y. Glycemic control and prevention of retinopathy in Japanese NIDDM patients. A 10-year follow-up study. *Diabetes Care.* abril de 1997;20(4):621-2.
32. Korac B, Kalezic A, Pekovic-Vaughan V, Korac A, Jankovic A. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biol.* junio de 2021;42:101887.
33. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* febrero de 2014;220(2):T47-59.
34. Sears B, Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids Health Dis.* 29 de septiembre de 2015;14:121.
35. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* enero de 1999;103(2):253-9.

36. Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem.* 7 de marzo de 2003;278(10):8199-211.
37. Szalat A, Durst R, Leitersdorf E. Managing dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* junio de 2016;30(3):431-44.
38. Haas ME, Attie AD, Biddinger SB. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab.* agosto de 2013;24(8):391-7.
39. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* septiembre de 2011;22(9):353-63.
40. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 de febrero de 2003;23(2):160-7.
41. Malave H, Castro M, Burkle J, Voros S, Dayspring T, Honigberg R, et al. Evaluation of low-density lipoprotein particle number distribution in patients with type 2 diabetes mellitus with low-density lipoprotein cholesterol <50 mg/dl and non-high-density lipoprotein cholesterol <80 mg/dl. *Am J Cardiol.* 1 de septiembre de 2012;110(5):662-5.
42. Do R, Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Gao C, Peloso GM, et al. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat Genet.* noviembre de 2013;45(11):1345-52.
43. Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol.* mayo de 2018;34(5):575-84.
44. Effects of Intensive Blood-Pressure Control in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 29 de abril de 2010;362(17):1575-85.

45. Mitchell BD, Stern MP, Haffner SM, Hazuda HP, Patterson JK. Risk factors for cardiovascular mortality in Mexican Americans and non-Hispanic whites. San Antonio Heart Study. *Am J Epidemiol.* marzo de 1990;131(3):423-33.
46. Pavlou DI, Paschou SA, Anagnostis P, Spartalis M, Spartalis E, Vryonidou A, et al. Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. *Maturitas.* junio de 2018;112:71-7.
47. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017. *Cardiovasc Diabetol.* 8 de junio de 2018;17:83.
48. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology.* febrero de 2011;11(2):98-107.
49. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* marzo de 2003;52(3):812-7.
50. Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol.* 2008;3(5):545-56.
51. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de enero de 2014;6(1):a009191.
52. van Greevenbroek MMJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med.* mayo de 2013;71(4):174-87.

53. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, et al. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol.* octubre de 2003;163(4):1233-43.
54. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 3 de abril de 2017;127(4):1589.
55. Böni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, et al. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology.* diciembre de 2009;150(12):5218-29.
56. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* enero de 2007;148(1):241-51.
57. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* 15 de julio de 2000;165(2):1013-21.
58. Basak S, Kim H, Kearns JD, Tergaonkar V, O'Dea E, Werner SL, et al. A fourth I κ B protein within the NF- κ B signaling module. *Cell.* 26 de enero de 2007;128(2):369-81.
59. Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovasc Res.* 1 de junio de 2011;90(3):421-9.
60. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig.* 1 de junio de 2010;1(3):77-89.
61. Poer JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* octubre de 2007;7(10):803-15.

62. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. mayo de 2004;286(5):C1195-1202.
63. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183-98.
64. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. septiembre de 2006;291(3):H985-1002.
65. Carrizzo A, Izzo C, Oliveti M, Alfano A, Virtuoso N, Capunzo M, et al. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 28 de septiembre de 2018 [citado 21 de mayo de 2019];19(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6212935/>
66. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*. 31 de agosto de 2018;17(1):121.
67. Dhananjayan R, Koundinya KSS, Malati T, Kutala VK. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J Clin Biochem*. octubre de 2016;31(4):372-9.
68. Kim J a, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 18 de abril de 2006;113(15):1888-904.
69. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. marzo de 2004;27(3):813-23.

70. Shiny A, Bibin YS, Shanthirani CS, Regin BS, Anjana RM, Balasubramanyam M, et al. Association of neutrophil-lymphocyte ratio with glucose intolerance: an indicator of systemic inflammation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* agosto de 2014;16(8):524-30.
71. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* febrero de 2005;11(2):191-8.
72. Drechsler M, Duchene J, Soehnlein O. Chemokines control mobilization, recruitment, and fate of monocytes in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mayo de 2015;35(5):1050-5.
73. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med.* julio de 2009;13(7):1211-20.
74. Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol.* enero de 2013;50(1):7-22.
75. Leick M, Azcutia V, Newton G, Luscinskas FW. Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell Tissue Res.* marzo de 2014;355(3):647-56.
76. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* diciembre de 1992;77(4):543-9.
77. Kulkarni H, Mamtani M, Peralta J, Almeida M, Dyer TD, Goring HH, et al. Soluble Forms of Intercellular and Vascular Cell Adhesion Molecules Independently Predict Progression to Type 2 Diabetes in Mexican American Families. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151177.

78. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Measuring leukocyte-endothelial interactions in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 1 de junio de 2013;2013(6):561-3.
79. Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, et al. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* octubre de 2011;96(10):3115-22.
80. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Apostolova N, Borrás C, Jover A, Bañuls C, et al. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med.* 15 de mayo de 2011;50(10):1215-21.
81. Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, Iannantuoni F, Lopez-Domenech S, de Marañón AM, Abad-Jimenez Z, et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes. *Sci Rep.* 26 de octubre de 2018;8(1):15862.
82. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1273042.
83. Chen C, Khismatullin DB. Oxidized low-density lipoprotein contributes to atherogenesis via co-activation of macrophages and mast cells. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123088.
84. Murphy JE, Vohra RS, Dunn S, Holloway ZG, Monaco AP, Homer-Vanniasinkam S, et al. Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2. *J Cell Sci.* 1 de julio de 2008;121(Pt 13):2136-47.
85. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl).* noviembre de 2017;95(11):1153-65.

86. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*. noviembre de 2011;17(11):1410-22.
87. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. diciembre de 2014;276(6):618-32.
88. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. julio de 2020;21(7):363-83.
89. Jackson MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, et al. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med*. 2002;23(1-3):209-85.
90. Kwak SH, Park KS, Lee KU, Lee HK. Mitochondrial metabolism and diabetes. *J Diabetes Investig*. 19 de octubre de 2010;1(5):161-9.
91. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J*. febrero de 2018;41(1):9-20.
92. Hunte C, Zickermann V, Brandt U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science*. 23 de julio de 2010;329(5990):448-51.
93. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, et al. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 1 de julio de 2005;121(7):1043-57.
94. Cramer WA, Hasan SS, Yamashita E. The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochim Biophys Acta*. julio de 2011;1807(7):788-802.
95. Shimada S, Shinzawa-Itoh K, Baba J, Aoe S, Shimada A, Yamashita E, et al. Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode. *EMBO J*. 1 de febrero de 2017;36(3):291-300.

96. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inher Metab Dis*. marzo de 2012;35(2):211-25.
97. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 25 de febrero de 2005;120(4):483-95.
98. Robb EL, Hall AR, Prime TA, Eaton S, Szibor M, Viscomi C, et al. Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *J Biol Chem*. 22 de junio de 2018;293(25):9869-79.
99. Clark IA, Cowden WB, Hunt NH. Free radical-induced pathology. *Med Res Rev*. 1985;5(3):297-332.
100. Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci*. 1 de febrero de 2016;146:163-73.
101. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11:694.
102. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 4 de junio de 2018;217(6):1915-28.
103. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 15 de septiembre de 2011;15(6):1583-606.
104. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9613090.
105. Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, de Marañon AM, Orden S, Alvarez A, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress,

- inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biol.* 2016;10:200-5.
106. Hwang NR, Yim SH, Kim YM, Jeong J, Song EJ, Lee Y, et al. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J.* 25 de septiembre de 2009;423(2):253-64.
 107. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 8 de octubre de 2004;279(41):42351-4.
 108. Yaribeygi H, Atkin SL, Sahebkar A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *J Cell Physiol.* febrero de 2019;234(2):1300-12.
 109. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 de abril de 2006;212(2):167-78.
 110. Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, Sander M, et al. Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* agosto de 2013;123(8):3305-16.
 111. Newsholme P, Keane KN, Carlessi R, Cruzat V. Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 de septiembre de 2019;317(3):C420-33.
 112. H K, N K, M M, Ta M. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation* [Internet]. 2010 [citado 1 de agosto de 2023];2010. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20182627/>
 113. Yung JHM, Giacca A. Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. *Cells.* 13 de marzo de 2020;9(3):706.

114. Patche J, Girard D, Catan A, Boyer F, Dobi A, Planesse C, et al. Diabetes-induced hepatic oxidative stress: a new pathogenic role for glycated albumin. *Free Radic Biol Med.* enero de 2017;102:133-48.
115. Han CY. Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue. *Diabetes Metab J.* agosto de 2016;40(4):272-9.
116. Kim SY, Jeong JM, Kim SJ, Seo W, Kim MH, Choi WM, et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4-MD2 complex. *Nat Commun.* 21 de diciembre de 2017;8(1):2247.
117. Kaplan JL, Marshall MA, C McSkimming C, Harmon DB, Garmey JC, Oldham SN, et al. Adipocyte progenitor cells initiate monocyte chemoattractant protein-1-mediated macrophage accumulation in visceral adipose tissue. *Mol Metab.* noviembre de 2015;4(11):779-94.
118. Eckel-Mahan K, Ribas Latre A, Kolonin MG. Adipose Stromal Cell Expansion and Exhaustion: Mechanisms and Consequences. *Cells.* 2 de abril de 2020;9(4):863.
119. Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, Shasha SM, Shapiro G, Nasser L, et al. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* enero de 2001;24(1):104-10.
120. Eid HM, Lyberg T, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I. Reactive oxygen species generation by leukocytes in populations at risk for atherosclerotic disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002;62(6):431-9.
121. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* abril de 2010;12(4):537-77.

122. Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol Syndromol*. julio de 2016;7(3):122-37.
123. Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem*. 10 de octubre de 1997;272(41):25409-12.
124. Ozawa T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. *Biosci Rep*. junio de 1997;17(3):237-50.
125. Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*. agosto de 2007;83(1):84-92.
126. Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*. 12 de octubre de 2001;276(41):37861-7.
127. Musatov A, Robinson NC. Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic Res*. noviembre de 2012;46(11):1313-26.
128. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. enero de 2007;292(1):C33-44.
129. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 15 de abril de 2011;435(2):297-312.
130. Wu J, Jin Z, Zheng H, Yan LJ. Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 10 de mayo de 2016;9:145-53.
131. del Campo A, Parra V, Vázquez-Trincado C, Gutiérrez T, Morales PE, López-Crisosto C, et al. Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by

- modulating Akt activity through mitochondrial Ca²⁺ uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1 de enero de 2014;306(1):E1-13.
132. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 1 de marzo de 2011;50(5):567-75.
 133. Gao W, Du X, Lei L, Wang H, Zhang M, Wang Z, et al. NEFA-induced ROS impaired insulin signalling through the JNK and p38MAPK pathways in non-alcoholic steatohepatitis. *J Cell Mol Med.* julio de 2018;22(7):3408-22.
 134. Lee HY, Lee JS, Alves T, Ladiges W, Rabinovitch PS, Jurczak MJ, et al. Mitochondrial-Targeted Catalase Protects Against High-Fat Diet-Induced Muscle Insulin Resistance by Decreasing Intramuscular Lipid Accumulation. *Diabetes.* agosto de 2017;66(8):2072-81.
 135. Koh JH, Johnson ML, Dasari S, LeBrasseur NK, Vuckovic I, Henderson GC, et al. TFAM Enhances Fat Oxidation and Attenuates High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Diabetes.* agosto de 2019;68(8):1552-64.
 136. Vernochet C, Damilano F, Mourier A, Bezy O, Mori MA, Smyth G, et al. Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. *FASEB J.* octubre de 2014;28(10):4408-19.
 137. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* agosto de 2018;104:485-95.
 138. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* septiembre de 2018;19(9):579-93.
 139. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci.* 15 de noviembre de 2013;126(Pt 22):5224-38.

140. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. abril de 2009;20(7):1992-2003.
141. Puente C, Hendrickson RC, Jiang X. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem*. 11 de marzo de 2016;291(11):6026-35.
142. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*. mayo de 2008;19(5):2092-100.
143. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*. 17 de julio de 2014;55(2):238-52.
144. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 23 de noviembre de 2000;408(6811):488-92.
145. Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*. agosto de 2016;49(8):424-30.
146. Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends Biochem Sci*. enero de 2017;42(1):28-41.
147. Chi C, Leonard A, Knight WE, Beussman KM, Zhao Y, Cao Y, et al. LAMP-2B regulates human cardiomyocyte function by mediating autophagosome-lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 de enero de 2019;116(2):556-65.

148. Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol.* 19 de diciembre de 2016;215(6):857-74.
149. Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science.* 25 de noviembre de 2016;354(6315):1036-41.
150. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* enero de 2011;469(7330):323-35.
151. Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, et al. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy.* enero de 2011;7(1):2-11.
152. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH. Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes.* abril de 2007;56(4):930-9.
153. Cnop M, Vidal J, Hull RL, Utzschneider KM, Carr DB, Schraw T, et al. Progressive loss of beta-cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* marzo de 2007;30(3):677-82.
154. Masini M, Bugliani M, Lupi R, del Guerra S, Boggi U, Filipponi F, et al. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia.* junio de 2009;52(6):1083-6.
155. Møller AB, Kampmann U, Hedegaard J, Thorsen K, Nordentoft I, Vendelbo MH, et al. Altered gene expression and repressed markers of autophagy in skeletal muscle of insulin resistant patients with type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2 de marzo de 2017;7:43775.

156. Munasinghe PE, Riu F, Dixit P, Edamatsu M, Saxena P, Hamer NSJ, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway. *Int J Cardiol.* 1 de enero de 2016;202:13-20.
157. Alizadeh S, Mazloom H, Sadeghi A, Emamgholipour S, Golestani A, Noorbakhsh F, et al. Evidence for the link between defective autophagy and inflammation in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients. *J Physiol Biochem.* agosto de 2018;74(3):369-79.
158. Chatterjee T, Pattanayak R, Ukil A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Autophagy protects peripheral blood mononuclear cells against inflammation, oxidative and nitrosative stress in diabetic dyslipidemia. *Free Radic Biol Med.* 1 de noviembre de 2019;143:309-23.
159. RostamiRad A, Ebrahimi SSS, Sadeghi A, Taghikhani M, Meshkani R. Palmitate-induced impairment of autophagy turnover leads to increased apoptosis and inflammation in peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology.* marzo de 2018;223(3):269-78.
160. Kirkin V. History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J Mol Biol.* 3 de enero de 2020;432(1):3-27.
161. Germain K, Kim PK. Pexophagy: A Model for Selective Autophagy. *Int J Mol Sci.* 16 de enero de 2020;21(2):578.
162. Chino H, Mizushima N. ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. *Trends Cell Biol.* mayo de 2020;30(5):384-98.
163. Schulze RJ, Sathyanarayan A, Mashek DG. Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* octubre de 2017;1862(10 Pt B):1178-87.

164. Yan C, Gong L, Chen L, Xu M, Abou-Hamdan H, Tang M, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy*. marzo de 2020;16(3):419-34.
165. Song Y, Zhou Y, Zhou X. The role of mitophagy in innate immune responses triggered by mitochondrial stress. *Cell Commun Signal*. 25 de noviembre de 2020;18(1):186.
166. Nakamura Y, Kitamura N, Shinogi D, Yoshida M, Goda O, Murai R, et al. BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. *PLoS One*. 2012;7(1):e30767.
167. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. septiembre de 2017;60(9):1577-85.
168. Zhou J, Massey S, Story D, Li L. Metformin: An Old Drug with New Applications. *Int J Mol Sci*. 21 de septiembre de 2018;19(10):2863.
169. Fontaine E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:753.
170. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 14 de febrero de 2013;494(7436):256-60.
171. Hunter RW, Hughey CC, Lantier L, Sundelin EI, Peggie M, Zeqiraj E, et al. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nat Med*. septiembre de 2018;24(9):1395-406.
172. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a

- partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep.* junio de 2014;66(3):418-29.
173. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* junio de 2005;54(6):829-34.
 174. Kooy A, de Jager J, Lehert P, Bets D, Wulffelé MG, Donker AJM, et al. Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med.* 23 de marzo de 2009;169(6):616-25.
 175. Goldberg R, Temprosa M, Otvos J, Brunzell J, Marcovina S, Mather K, et al. Lifestyle and metformin treatment favorably influence lipoprotein subfraction distribution in the Diabetes Prevention Program. *J Clin Endocrinol Metab.* octubre de 2013;98(10):3989-98.
 176. de Jager J, Kooy A, Schalkwijk C, van der Kolk J, Lehert P, Bets D, et al. Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Intern Med.* enero de 2014;275(1):59-70.
 177. Kolishetti N, Dhar S, Valencia PM, Lin LQ, Karnik R, Lippard SJ, et al. Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 19 de octubre de 2010;107(42):17939-44.
 178. Rahimi M, Wadajkar A, Subramanian K, Yousef M, Cui W, Hsieh JT, et al. In vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine.* octubre de 2010;6(5):672-80.
 179. Charbgo F, Ahmad MB, Darroudi M. Cerium oxide nanoparticles: green synthesis and biological applications. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1401-13.

180. Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. diciembre de 2009;5(24):2848-56.
181. Colon J, Hsieh N, Ferguson A, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW, et al. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. *Nanomedicine*. octubre de 2010;6(5):698-705.
182. Das M, Patil S, Bhargava N, Kang JF, Riedel LM, Seal S, et al. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*. abril de 2007;28(10):1918-25.
183. Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*. 31 de marzo de 2006;342(1):86-91.
184. Tarnuzzer RW, Colon J, Patil S, Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett*. diciembre de 2005;5(12):2573-7.
185. Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 1 de febrero de 2007;73(3):549-59.
186. Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*. 14 de marzo de 2007;(10):1056-8.
187. Nelson BC, Johnson ME, Walker ML, Riley KR, Sims CM. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants (Basel)*. 17 de mayo de 2016;5(2):E15.

188. Herance JR, García H, Gutiérrez-Carcedo P, Navalón S, Pineda-Lucena A, Palomino-Schätzlein M. A translational approach to assess the metabolomic impact of stabilized gold nanoparticles by NMR spectroscopy. *Analyst*. 11 de febrero de 2019;144(4):1265-74.
189. Bhagat S, Srikanth Vallabani NV, Shutthanandan V, Bowden M, Karakoti AS, Singh S. Gold core/ceria shell-based redox active nanozyme mimicking the biological multienzyme complex phenomenon. *J Colloid Interface Sci*. 1 de marzo de 2018;513:831-42.
190. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. abril de 2006;6(4):662-8.
191. Menchón C, Martín R, Apostolova N, Victor VM, Alvaro M, Herance JR, et al. Gold nanoparticles supported on nanoparticulate ceria as a powerful agent against intracellular oxidative stress. *Small*. 25 de junio de 2012;8(12):1895-903.
192. Versiani AF, Andrade LM, Martins EM, Scalzo S, Geraldo JM, Chaves CR, et al. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. *Future Virology*. 1 de abril de 2016;11(4):293-309.
193. Mahmoudi F, Mahmoudi F, Gollo KH, Amini MM. Novel Gold Nanoparticles: Green Synthesis with *Eryngium thyrsoideum* Boiss Extract, Characterization, and In Vivo Investigations on Inflammatory Gene Expression and Biochemical Parameters in Type 2 Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res*. 1 de mayo de 2022;200(5):2223-32.
194. Ponnaijakamideen M, Rajeshkumar S, Vanaja M, Annadurai G. In Vivo Type 2 Diabetes and Wound-Healing Effects of Antioxidant Gold Nanoparticles Synthesized Using the Insulin Plant *Chamaecostus cuspidatus* in Albino Rats. *Can J Diabetes*. marzo de 2019;43(2):82-89.e6.

195. Alenazi F, Saleem M, Khaja ASS, Zafar M, Alharbi MS, Hagbani TA, et al. Metformin encapsulated gold nanoparticles (MTF-GNPs): A promising antiglycation agent. *Cell Biochem Funct.* octubre de 2022;40(7):729-41.
196. Khan S, Wang CH. ER stress in adipocytes and insulin resistance: mechanisms and significance (Review). *Mol Med Rep.* noviembre de 2014;10(5):2234-40.
197. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 15 de octubre de 2004;306(5695):457-61.
198. Yakimovich NO, Ezhevskii AA, Guseinov DV, Smirnova LA, Gracheva TA, Klychkov KS. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Russ Chem Bull.* 1 de marzo de 2008;57(3):520-3.
199. BarathManiKanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SRK, Youn H seop, Eom S, et al. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Journal of Nanobiotechnology.* 14 de julio de 2010;8(1):16.
200. Kiely JM, Luscinskas FW, Gimbrone MA. Leukocyte-endothelial monolayer adhesion assay (static conditions). *Methods Mol Biol.* 1999;96:131-6.
201. Babu KS, Anandkumar M, Tsai TY, Kao TH, Inbaraj BS, Chen BH. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:5515-31.
202. van Stee MF, de Graaf AA, Groen AK. Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy. *Cardiovasc Diabetol.* 30 de junio de 2018;17(1):94.

203. de Marañón AM, Canet F, Abad-Jiménez Z, Jover A, Morillas C, Rocha M, et al. Does Metformin Modulate Mitochondrial Dynamics and Function in Type 2 Diabetic Patients? *Antioxid Redox Signal*. 10 de agosto de 2021;35(5):377-85.
204. Bhansali S, Bhansali A, Dutta P, Walia R, Dhawan V. Metformin upregulates mitophagy in patients with T2DM: A randomized placebo-controlled study. *J Cell Mol Med*. marzo de 2020;24(5):2832-46.
205. Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Lopez-Domenech S, Escribano-Lopez I, Veses S, et al. Does Metformin Protect Diabetic Patients from Oxidative Stress and Leukocyte-Endothelium Interactions? *Antioxid Redox Signal*. 10 de diciembre de 2017;27(17):1439-45.
206. Apostolova N, Iannantuoni F, Gruevska A, Muntane J, Rocha M, Victor VM. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox Biol*. julio de 2020;34:101517.
207. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect*. marzo de 2015;4(1):R1-15.
208. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol*. abril de 2017;11:637-45.
209. Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Matsushima S, Inoue N, Ohta Y, et al. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. septiembre de 2009;297(3):H1069-1077.
210. Croston TL, Thapa D, Holden AA, Tveter KJ, Lewis SE, Shepherd DL, et al. Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 de julio de 2014;307(1):H54-65.

211. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* octubre de 2001;108(8):1167-74.
212. Cheng JT, Huang CC, Liu IM, Tzeng TF, Chang CJ. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* marzo de 2006;55(3):819-25.
213. Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, et al. Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission. *Diabetes.* enero de 2017;66(1):193-205.
214. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 4 de abril de 2007;26(7):1749-60.
215. Lemasters JJ. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol.* 2014;2:749-54.
216. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* 16 de mayo de 2003;300(5622):1140-2.
217. Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S. Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol (1985).* diciembre de 2006;101(6):1685-92.
218. Czajka A, Ajaz S, Gnudi L, Parsade CK, Jones P, Reid F, et al. Altered Mitochondrial Function, Mitochondrial DNA and Reduced Metabolic Flexibility in Patients With Diabetic Nephropathy. *EBioMedicine.* junio de 2015;2(6):499-512.

219. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 de julio de 2003;100(14):8466-71.
220. Aatsinki SM, Buler M, Salomäki H, Koulu M, Pavek P, Hakkola J. Metformin induces PGC-1 α expression and selectively affects hepatic PGC-1 α functions. *Br J Pharmacol*. mayo de 2014;171(9):2351-63.
221. Tandler B, Hoppel CL, Mears JA. Morphological Pathways of Mitochondrial Division. *Antioxidants (Basel)*. 15 de febrero de 2018;7(2):30.
222. Wakabayashi T. Megamitochondria formation - physiology and pathology. *J Cell Mol Med*. 2002;6(4):497-538.
223. Woo CY, Kc R, Kim M, Kim HS, Baek JY, Koh EH. Autophagic flux defect in diabetic kidney disease results in megamitochondria formation in podocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 de enero de 2020;521(3):660-7.
224. Ma Z, Wirström T, Borg LAH, Larsson-Nyrén G, Hals I, Bondo-Hansen J, et al. Diabetes reduces β -cell mitochondria and induces distinct morphological abnormalities, which are reproducible by high glucose in vitro with attendant dysfunction. *Islets*. 2012;4(3):233-42.
225. Wang Y, An H, Liu T, Qin C, Sesaki H, Guo S, et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep*. 5 de noviembre de 2019;29(6):1511-1523.e5.
226. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. enero de 2006;91(1):336-40.

227. Amoani B, Sakyi SA, Mantey R, Laing EF, Ephraim RD, Sarfo-Katanka O, et al. Increased metformin dosage suppresses pro-inflammatory cytokine levels in systemic circulation and might contribute to its beneficial effects. *J Immunoassay Immunochem*. 4 de mayo de 2021;42(3):252-64.
228. Chai WF, Tang KS. Protective potential of cerium oxide nanoparticles in diabetes mellitus. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 1 de julio de 2021;66:126742.
229. Gojova A, Lee JT, Jung HS, Guo B, Barakat AI, Kennedy IM. Effect of cerium oxide nanoparticles on inflammation in vascular endothelial cells. *Inhal Toxicol*. julio de 2009;21 Suppl 1:123-30.
230. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 29 de octubre de 2010;107(9):1058-70.
231. Prieto D, Contreras C, Sánchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*. mayo de 2014;12(3):412-26.
232. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, de Pablo C, et al. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care*. junio de 2013;36(6):1695-702.
233. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. octubre de 2004;19(10):2505-12.
234. Bajpai A, Tilley DG. The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2018;9:1547.

235. Lim S, Rashid MA, Jang M, Kim Y, Won H, Lee J, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic β -cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(5):873-86.
236. Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*. junio de 2011;14(11):2201-14.
237. Collier JJ, Suomi F, Oláhová M, McWilliams TG, Taylor RW. Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Mol Med*. 7 de diciembre de 2021;13(12):e14824.
238. Shadab M, Millar MW, Slavin SA, Leonard A, Fazal F, Rahman A. Autophagy protein ATG7 is a critical regulator of endothelial cell inflammation and permeability. *Sci Rep*. 13 de agosto de 2020;10(1):13708.

ANEXOS

8 ANEXO I: PUBLICACIONES

Título: Gold Nanoparticles Supported on Ceria Nanoparticles Modulate Leukocyte–Endothelium Cell Interactions and Inflammation in Type 2 Diabetes

Autores: Pedro Díaz-Pozo, Francisco Canet, Abdessamad Grrirane, Sandra Lopez-Domenech, José Raul Herance, Nadezda Apostolova , Clara Luna-Marco, Susana Rovira-Llopis, Miguel Marti, Carlos Morillas, Milagros Rocha, Hermenegildo Garcia y Victor M. Victor

Revista: Antioxidants

Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox11112297>



Article

Gold Nanoparticles Supported on Ceria Nanoparticles Modulate Leukocyte–Endothelium Cell Interactions and Inflammation in Type 2 Diabetes

Pedro Díaz-Pozo ¹ , Francisco Canet ¹ , Abdessamad Grirrane ² , Sandra Lopez-Domenech ^{1,3} , José Raul Herance ^{4,5} , Nadezda Apostolova ^{1,3,6} , Clara Luna-Marco ^{1,7} , Susana Rovira-Llopis ^{1,7} , Miguel Martí ³ , Carlos Morillas ¹ , Milagros Rocha ^{1,6,*} , Hermenegildo Garcia ^{2,*} and Victor M. Victor ^{1,6,7,*}

- ¹ Service of Endocrinology and Nutrition, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), University Hospital Doctor Peset, 46017 Valencia, Spain
 - ² Instituto Universitario de Tecnología Química CSIC-UPV, Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain
 - ³ Department of Pharmacology, University of Valencia, 46003 Valencia, Spain
 - ⁴ Medical Molecular Imaging Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, CIBBIM-Nanomedicine, 08035 Barcelona, Spain
 - ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina CIBERBBN, 28029 Madrid, Spain
 - ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 46010 Valencia, Spain
 - ⁷ Department of Physiology, INCLIVA (Biomedical Research Institute Valencia), University of Valencia, 46010 Valencia, Spain
- * Correspondence: milagros.rocha@uv.es (M.R.); hgarcia@qim.upv.es (H.G.); victor.victor@uv.es (V.M.V.); Tel.: +34-963-189-132 (V.M.V.); Fax: +34-961-622-492 (V.M.V.)



Citation: Díaz-Pozo, P.; Canet, F.; Grirrane, A.; Lopez-Domenech, S.; Herance, J.R.; Apostolova, N.; Luna-Marco, C.; Rovira-Llopis, S.; Martí, M.; Morillas, C.; et al. Gold Nanoparticles Supported on Ceria Nanoparticles Modulate Leukocyte–Endothelium Cell Interactions and Inflammation in Type 2 Diabetes. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2297. <https://doi.org/10.3390/antiox11112297>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 7 October 2022

Accepted: 16 November 2022

Published: 20 November 2022

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



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Gold-ceria nanoparticles (Au/CeO₂) are known to have antioxidant properties. However, whether these nanoparticles can provide benefits in type 2 diabetes mellitus (T2D) remains unknown. This work aimed to study the effects of Au/CeO₂ nanoparticles at different rates of gold purity (10, 4.4, 1.79 and 0.82) on leukocyte–endothelium interactions and inflammation in T2D patients. Anthropometric and metabolic parameters, leukocyte–endothelium interactions, ROS production and NF-κB expression were assessed in 57 T2D patients and 51 healthy subjects. T2D patients displayed higher Body Mass Index (BMI) and characteristic alterations in carbohydrate and lipid metabolism. ROS production was increased in leukocytes of T2D patients and decreased by Au/CeO₂ at 0.82% gold. Interestingly, Au/CeO₂ 0.82% modulated leukocyte–endothelium interactions (the first step in the atherosclerotic process) by increasing leukocyte rolling velocity and decreasing rolling flux and adhesion in T2D. A static adhesion assay also revealed diminished leukocyte–endothelium interactions by Au/CeO₂ 0.82% treatment. NF-κB (p65) levels increased in T2D patients and were reduced by Au/CeO₂ treatment. Cell proliferation, viability, and apoptosis assays demonstrated no toxicity produced by Au/CeO₂ nanoparticles. These results demonstrate that Au/CeO₂ nanoparticles at 0.82% exert antioxidant and anti-inflammatory actions in the leukocyte–endothelium interaction of T2D patients, suggesting a protective role against the appearance of atherosclerosis and cardiovascular diseases when this condition exists.

Keywords: gold-ceria nanoparticle; ROS; diabetes; inflammation; atherosclerosis

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a serious health problem worldwide; the prevalence is increasing and reducing life expectancy [1,2]. It has been demonstrated that T2D is related to cardiovascular risk factors, including obesity, hypertension, dyslipidaemia, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease [3], though for some, the molecular mechanisms remain to be elucidated.

T2D has been related to oxidative stress and therefore to an increased production of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, alterations of the cellular homeostasis and redox state. As the main source of ROS, mitochondria are particularly vulnerable to hyperglycaemic conditions, which lead to enhanced ROS production and oxidative stress [4]. In this sense, oxidative stress and mitochondrial impairment have been related to the onset of insulin resistance, T2D and cardiometabolic diseases [5].

T2D and inflammation are interconnected, playing a key role in host defences; in fact, different studies highlight that the inflammatory process is an important player in the pathogenesis of dyslipidaemia and hyperglycaemia [6]. T2D is a chronic and low-grade inflammatory process that takes place mainly to the presence of high levels of glucose and fatty acids on leukocytes [7,8]. In addition, it has been observed that nuclear factor kappa B (NF- κ B), a key player in the inflammatory process, cellular homeostasis and immunity is enhanced under hyperglycaemia [9]. During this process, there is an increased adhesion of leukocytes to the endothelium, after which they migrate in order to eliminate pathogens through the generation of ROS. It is important to mention that an increased ROS production and oxidative stress can promote mitochondrial impairment, which is associated to endothelial dysfunction and eventually in leukocyte–endothelium interactions, inflammatory processes and thrombosis [10]. Therefore, the need for novel therapies that modulate ROS production and oxidative stress in cardiometabolic diseases such as T2D is paramount. In this scenario, the use of nanomaterials to modulate the deleterious effects of T2D offers great potential.

The use of nanoparticles (NPs) in biomedicine is growing, with a variety of potential applications, including antioxidant therapy, bioimaging and drug delivery [11–14]. Among the different types of NPs, ceria (CeO₂) NPs are specially promising due to their versatility, biocompatibility and physicochemical properties [15]. Furthermore, it has been demonstrated that CeO₂ has antioxidant properties and can be used for combating oxidative stress [16,17]. This antioxidant capacity can be increased when NPs are combined with certain metals, including silver, platinum or gold [18,19]. These combinations have demonstrated biocompatible properties by which they act as ROS scavengers and catalase-like enzymes, therefore modulating oxidative stress conditions [20–22]. Various human diseases may benefit from nanotherapeutics, and T2D is among them. In biomedical applications, gold NPs (AuNPs) are among the most promising NPs [23]. In this sense, gold nanoparticles have demonstrated beneficial effects in animal models of diabetes by decreasing hepatic enzymes, TNF- α and interleukin-6 [24], or by restoring blood glucose, glycogen and insulin levels [25]. Furthermore, gold nanoparticles can be bioconjugated with metformin, a gold standard treatment for type 2 diabetes, demonstrating beneficial actions by inhibiting the production of advanced glycation end products (AGEs), and by reducing hyperchromicity, early glycation products, carbonyl content, hydroxymethylfurfural content and production of fluorescent AGEs [26].

Although the aetiology of insulin resistance and T2D is intricate, different studies have reported that ROS can induce oxidative stress and thereby exacerbate insulin resistance [27,28], which highlights the therapeutic potential of antioxidants. In this sense, abundant evidence, both in vitro and in vivo, supports the potential of gold NPs as antioxidants [29] in models of T2D [30], amongst others.

In the present study, we evaluate the potential therapeutic benefits of CeO₂-supported gold (Au/CeO₂) NPs with different rates of gold purity in leukocyte–endothelial interactions, and we evaluate their impact on NF- κ B in leukocytes from T2D patients.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Sample Collection

This study is prospective and observational in a cohort of 57 T2D patients—attending the Endocrinology Service of the University Hospital Doctor Peset (Valencia, Spain) and diagnosed according to the American Diabetes Association's criteria—and 51 matched

healthy controls. Patients were recruited according to the standard clinical protocols in the hospital.

The inclusion criteria were aged between 40 and 70 years and an evolution of diabetes of over 10 years. The exclusion criteria were significant renal impairment (creatinine > 1.5 mg/dL or eGFR < 60 mL/min/1.73 m²), a smoking habit, frequent alcohol intake, severe diabetic neuropathy, morbid obesity (Body Mass Index; BMI > 40 kg/m²) and the presence of chronic diseases other than those directly related to cardiovascular risk. All subjects were informed about the procedures and evaluated parameters and gave their informed written consent. The study was approved from the Hospital's Ethics Committee (CEIC 98/19) and was performed in compliance with the statement of ethical principles for medical research of the Declaration of Helsinki.

2.2. Biochemical Parameters

Venous blood was collected into Vacutainer® tubes in fasting conditions between 8 AM and 10 AM. Samples were then centrifuged for 10 min at $1500 \times g$ at 4 °C to separate serum from blood. Glucose, total cholesterol, and triglycerides were obtained by an enzymatic method; high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) was determined employing a Beckman LX-20 autoanalyser (Beckman Coulter, La Brea, CA, USA) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was quantified using Friedewald's formula. Immunochemiluminescence was used to measure insulin levels and HOMA-IR index (fasting insulin (U/mL) fasting glucose (mg/dL)/405). Glycosylated Haemoglobin Type A1C (HbA1c) percentage was determined with a glycohaemoglobin analyser (Arkray Inc., Kyoto, Japan) and high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) levels were evaluated by an immunonephelometric assay.

2.3. Leukocyte Isolation

Polymorphonuclear cells (PMN) were obtained from heparinised blood samples. First, PMN were incubated for 45 min with a 1:2 volume of dextran solution (3%) in NaCl (0.9%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the supernatant was centrifuged over Fycoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for 25 min at $650 \times g$. The resulting pellet was then incubated with lysis buffer to eliminate remaining erythrocytes (5 min at RT) and centrifuged at $250 \times g$. Finally, pellets containing PMN were washed twice and resuspended with Hank's balanced salt solution (HBSS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), depending on their experimental use. In addition, LUNA-FL (Logos Biosystems Inc., Annandale, VA, USA) was used to determine cell count and viability (acridine orange and propidium iodide double stain). A human macrophage-like (U937) cell line was employed for proliferation and viability studies.

2.4. Isolation of Human Endothelial Cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cells were obtained from the umbilical cords of patients undergoing a normal delivery. Cells were separated using the method previously described by our group [31] and cultured at 5% CO₂ and 37 °C until they reached pre-confluence. For culture, we used endothelial cell growth medium-2 (EGM-2) containing penicillin, streptomycin and fungizone, which were employed in the culture. HUVEC were then incubated for 3 h with 0.02 mg/mL Au/CeO₂.

2.5. Materials and Instrumentation

Photoluminescence evaluation were conducted in a solution containing acetonitrile at room temperature (RT) in N₂-purged septum-capped quartz cells using a Xe-doped mercury lamp, an Edinburgh FL3000 spectrofluorometer (Edinburgh Instruments, Livingston, Scotland) and a Czerny-Turner monochromator (InfoCrops, Shanghai, China).

High-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) images and measurements were performed with JEOL JEM-2100F equipment at the Universidad Politécnica

de Valencia, under an accelerating voltage of 200 kV. Samples were prepared by applying one drop of the suspended material in ethanol onto a carbon-coated copper TEM grid and allowing it to dry at RT. X-ray photoelectron spectra (XPS) were measured on a SPECS spectrometer (SPECS Surface Nano Analysis GmbH, Berlin, Germany) equipped with a Phoibos 150-MCD-9 detector and using a non-monochromatic Al K (1486.6 eV) X-ray source. Spectra were recorded at 200 °C, using an analyser pass energy of 30 eV and an X-ray power of 50 W, and the samples were evacuated into the prechamber of the spectrometer at 1×10^{-9} mbar. The measured intensity ratios of the components were obtained from the area of the corresponding peaks after nonlinear Shirley-type background subtraction, corrected by the transition function of the spectrometer. During the data processing of the XPS spectra, binding energy (BE) values were referenced to the C1s signal. Spectra treatment was performed using the CASA software (version 6.5, <https://casa.nrao.edu/>) (accessed on 27 October 2022). Zeta potential and particle size of Au/CeO₂ particles suspended in neutral H₂O were measured with a Malvern Zetasizer instrument (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) at 5 ppm concentration (see Supplementary File).

Unless otherwise indicated, solvents and reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Synthesis of Au/CeO₂ was as follows: Preparation of the gold catalysts that were to be supported on the cerium oxide nanoparticulates was carried out by impregnation using the following procedure. A 0.82 wt% Au/CeO₂ catalyst was prepared by impregnating 5 g of CeO₂ (Rodhia, Barcelona, Spain) with a solution of 0.90 g of NaAuCl₄ in 40 mL of H₂O (milliQ, Madrid, Spain). The slurry was stirred for 12 h at RT, after which all the liquid was evaporated and the solid dried at 100 °C for 3 h. Next, the solid was reduced and activated by pouring it into boiling 1-phenylethanol (60 mL) at 160 °C for 3 h. The catalyst was then filtered and washed consecutively with water (exhaustive washings with 3 L of distilled water), acetone (100 mL) and diethyl ether (50 mL) and dried under a vacuum at 100 °C for 2 h. Au analysis by XR fluorescence revealed that the Au content was approximately 0.82 wt%, which was close to the optimal value. Other Au/CeO₂ catalysts containing higher gold concentrations were prepared following the abovementioned procedure but using larger quantities of NaAuCl₄.

Four batches of nanoparticles were prepared with varying amounts of gold (10, 4.4, 1.79 and 0.82), expressed as a% of the total weight at the Institute of Chemical Technology (ITQ, Valencia, Spain).

2.6. Evaluation of Leukocyte–Endothelium Interactions

First, we evaluated the anti-inflammatory capacity of NPs with different amounts of Au (10, 4.4, 1.79 and 0.82), expressed as a % of the total weight (Au/CeO₂) at the same concentration (0.02 mg/mL). We employed 1.2 mL of T2D and control peripheral blood PMN with a 10^6 cell/mL density in complete RPMI. Three/four days prior to the experiment, primary cultures of HUVEC were prepared. PMN were passed along the HUVEC monolayer at a velocity of 0.3 mL/min during 5 min and were recorded throughout. Therefore, the leukocyte rolling velocity was evaluated by measuring the time taken by the PMN to cover 200 micrometres. PMN rolling flux was evaluated over a 1 min period and adhesion was determined by measuring the PMN adhering to the endothelium in 5 separate fields over a period of at least 30 s.

2.7. Au/CeO₂ Catalyst Preparation

Preparation of the catalysts on the CeO₂ nanoparticles by impregnation was performed following the procedure, exemplified by a particular Au loading: 0.82, 1.79, 4.4 and 10 wt%. Au/CeO₂ catalysts were prepared by impregnating 5 g of CeO₂ with a solution of 0.90 g NaAuCl₄ in 40 mL ultrapure H₂O. The slurry was stirred for 12 h at RT, after which all the liquid was allowed to evaporate. The remaining solid was dried at 100 °C for 3 h, and was then reduced and activated by pouring it into boiling 1-phenylethanol (at 160 °C), where it was kept for 3 h. The catalyst was then filtered and washed consecutively by water (exhaustive washings with distilled water: 3 L), acetone (100 mL) and diethyl

ether (50 mL) and dried under a vacuum at 100 °C for 2 h. Au analysis by quantitative fluorescence X-ray emission revealed that the Au contents were close to the expected value according to the NaAuCl₄ amount added to the solution. Dynamic laser scattering of the Au/CeO₂ NPs dispersed in neutral aqueous solutions revealed a mononodal particle size distribution of an average size of 4.562 and 6.1856 nm for the 0.82 and 1.79 wt%. Au/CeO₂ catalysts, respectively (See the Supplementary Material). The electrostatic potentials for agglomeration were −31.9, −17.1 mV for 0.82 and 1.79 Au loading, respectively, indicating that these suspensions are persistent in water, particularly for the lowest Au loading.

2.8. Static Leukocyte–Endothelial Interaction Assay

We performed a modified version of the leukocyte–endothelial monolayer adhesion assay [32]. First, PMN were isolated and labelled with 2 μM 2', 7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5 (and-6) carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to a final concentration of 2×10^6 cells/mL. Simultaneously, HUVEC were seeded in 96-well microtiter tissue-culture plates (Corning, Glendale, United States) and cultured until they reached pre-confluence. A total of 3 h prior to the assay, HUVEC were treated with DMSO (0.141 M), TNF-α (5 ng/mL) and Au/CeO₂ NPs (0.02 mg/mL). HUVEC were then washed once with RPMI + 1% Fetal bovine serum (FBS). Next, 100 μL of the BCECF-AM labelled PMN suspension was added to each well and allowed to interact with HUVEC for 45 min. After this, PMN were removed, and each well was washed three times with HBSS to eliminate any non-adhering PMN. Finally, the well contents were solubilised in 150 μL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS in water, pH 8.2–8.4) and the plates were measured by the microplate reader Synergy Mx (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany).

2.9. Cellular Viability and Proliferation

U937 (ATCC® CRL1593.2™) cells were seeded in 24-well plates at 100,000 cells/well in RPMI supplemented with 10% FBS. Treatment with Au/CeO₂ or DMSO was administered over 3 h, after which the medium was refreshed, and the U937 proliferated for 3 days. At 24, 48 and 72 h, the cells were analysed with LUNA-FL to assess cell number and viability (acridine orange and propidium iodide double stain). All treatments were performed in triplicate.

2.10. Evaluation of Apoptosis

U937 cells were seeded in 24-well plates at 500,000 cells/well in RPMI supplemented with 10% FBS. Treatment with Au/CeO₂ or DMSO was administered over 3 h, after which the medium was refreshed, and cells were cultured for a further 21 h. The well-known apoptosis inducer staurosporine (STS) was used as a positive control for cell death. The FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, CA, USA) was employed for the assay. Cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in $1 \times$ binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Subsequently, 100 μL of the solution (1×10^5 cells) were transferred to a 5 mL culture tube, to which 5 μL of FITC Annexin V and 5 μL of propidium iodide were added. The presence of four populations were evaluated: apoptotic (AnnV+/PI−), vital (AnnV−/PI−), late apoptotic/necrotic (AnnV+/PI+), and damaged cells (AnnV−/PI+).

2.11. Measurement of Total ROS Production

PMN were seeded in 48-well plates and were treated after 24 h with the NPs from the cell culture media at a concentration of 0.02 mg/mL for 3 h. Total ROS production was evaluated by fluorescence (IX81 Olympus, Hamburg, Germany) after 30 min incubation in HBSS (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Sant Cugat del Vallés, Spain) with 5 μM Hoechst 33342 (for nuclei) and 5 μM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA for ROS) (both from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Therefore, cells were washed twice with HBSS and a total of 20–30 images per well were recorded with a fluorescence microscope coupled

with static cytometry software (“ScanR” version 2.03.2, IX81 Olympus Europa, Hamburg, Germany). Controls were performed by using HBSS.

2.12. Western Blotting

First, PMN were isolated as described in Section 2.3 and resuspended to a final concentration of 1×10^6 cells/mL. Simultaneously, HUVEC were seeded in 25 cm² flask and cultured until they reached pre-confluence. 3 h prior to the assay, HUVEC were treated with 0.82% Au/CeO₂ nanoparticles (0.02 mg/mL). Next, 5 mL of the PMN suspension was added to each flask and allowed to interact with HUVEC for 3 h. After this time, PMN and HUVEC were stored separately. Afterwards, HUVEC pellets were incubated in RIPA Buffer during 15 min (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a protease inhibitor cocktail (Merck Life Science S.L.U., Madrid, Spain). Tubes were then vortexed and sonicated 3 times, for 10 s each time, to disrupt cell membranes, and were centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min. Supernatants were stored at -80°C until further use. A BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Sant Cugat del Vallés, Spain) was used for protein concentration determination and 25 µg protein per sample were loaded onto 4–20% SDS-polyacrylamide gels. Gel electrophoresis was performed at 150 V, for 90 min, after which proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 400 mA for 1 h. Membranes were then blocked at RT for 1 h in 5% non-fat milk in TBS-T buffer containing 150 mM sodium chloride, 0.1% Tween20 and 25 mM Tris at pH 7.5. After eliminating the excess blocking buffer, membranes were incubated overnight at 4°C with anti NF-κB rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK) and anti-actin mouse polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), and subsequently with horseradish peroxidase goat anti-rabbit (Millipore Iberica, Madrid, Spain) or horseradish peroxidase (HRP) goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, Sant Cugat del Vallés, Spain) secondary antibodies, as appropriate, for 1 h at RT. After removing the excess of antibody, protein expression was evaluated with a ECL plus reagent (GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont, UK) or Supersignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, Sant Cugat del Vallés, Spain) using the Fusion FX5 acquisition system (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) for chemiluminescence signal detection. Data were analysed by densitometry using Bio1D software (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). All protein expression values were normalised to those of actin in the same sample and an internal control was included in each blot.

2.13. Statistical Analysis

Data analysis was performed with SPSS 25.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA). Results for parametric and non-parametric variables were expressed as mean $\pm$ SD and median (25th–75th percentiles), respectively. Statistical analysis was performed with a Student’s *t*-test for normally distributed data, Mann–Whitney U test for non-normally distributed values, and a chi-square test for proportion of frequencies. In addition, the influence of BMI on biochemical parameters was evaluated with an univariate general linear model using BMI as a covariate. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Graphs were plotted with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Clinical and Endocrine Characteristics of the Study Subjects

A total of 51 T2D patients were analysed and compared with 57 age- and sex-matched healthy subjects. Biochemical and anthropometric parameters are shown in Table 1.

T2D patients displayed an altered carbohydrate metabolism with respect to the control group. Glucose, insulin, HOMA-IR and HbA1c levels were significantly higher than among controls ($p < 0.001$). In addition, higher values of upper waist circumference ($p < 0.001$), BMI, weight and hs-CRP were observed in the T2D group ($p < 0.001$). In terms of lipid profile, a lower HDL-c level ($p < 0.001$) and a higher triglyceride concentration ($p < 0.001$) were characteristics of our T2D patients; however, due to the presence of lipid-lowering

therapy involving statins (64%), total cholesterol ($p < 0.001$) and LDL-c levels ($p < 0.001$) were slightly lower. When statistical significance was recalculated after adjusting for BMI, all the parameters' differences remained statistically significant, except for triglycerides and hs-CRP.

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters.

	Control	T2D	<i>p</i> -Value	BMI Adjusted <i>p</i> -Value
<i>n</i>	57	51		
Age (years)	53.7 ± 7.7	57.10 ± 10.3	NS	
Weight (kg)	72.8 ± 18.0	84.7 ± 16.4	<0.001	
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 4.14	30.6 ± 5.48	<0.001	
Waist (cm)	87.7 ± 12.7	103.5 ± 11.7	<0.001	
Glucose (mg/dL)	94.1 ± 9.4	153.7 ± 45.0 ***	<0.001	<0.001
Insulin (μL/mL)	7.19 ± 2.62	25.9 ± 15.7 ***	<0.001	<0.001
HOMA-IR	1.67 ± 0.70	9.74 ± 6.87 ***	<0.001	<0.001
HbA _{1c} (%)	5.31 ± 0.34	7.14 ± 1.16 ***	<0.001	<0.001
TC (mg/dL)	203.7 ± 34.5	158.7 ± 39.1 ***	<0.001	<0.001
HDL-c (mg/dL)	57.2 ± 19.7	43.5 ± 9.85 **	<0.001	<0.003
LDL-c (mg/dL)	126.5 ± 29.5	87.0 ± 31.7 ***	<0.001	<0.001
TG (mg/dL)	90.5 (62.8–150.5)	132 (92.8–164.75) **	<0.009	NS
Hs-CRP (mg/L)	1.17 (0.44–2.17)	2.45 (1.22–5.39)	<0.001	NS

Values are expressed as mean ± standard deviation for parametric data and as median (25th and 75th percentiles) for non-parametric data. The three groups were compared with one-way analysis of variance (and Student–Newman–Keuls post hoc test) or the Kruskal–Wallis test (and Dunn's multiple-comparison post hoc test) for parametric and non-parametric data, respectively. The analysis of covariance was performed with a univariate general linear model using the BMI as a covariate. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ with respect to control. Abbreviations: BMI, body-mass index; HbA_{1c}, glycated haemoglobin A1c; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; hs-CRP, highsensitive C-reactive protein; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; T2D, type 2 diabetes; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; NS: not significant.

3.2. Characterisation of Nanoparticles

We have characterised the NPs with the following techniques. Figure 1 shows the selected HR-TEM and STEM images for a sample of 0.82 wt% Au/CeO₂ with the presence of Au NPs.

Therefore, we performed a dark field scanning electron microscopy of 0.82% AuCeO₂ catalyst and EDX elemental mapping. Elemental mapping at the microscopic level of this catalyst (presented in Figure 2) revealed a homogeneous dispersion of Au on the CeO₂ support in a sample of 0.82 wt% Au/CeO₂; i.e., there was a similar distribution of both elements.

In addition, we evaluated HR-STEM images and corresponding histograms of nanoparticle size distribution (Figure 3).

Finally, in Figure 4: (A) Gold peaks of the XPS spectrum corresponding to the Au 4f region in a sample of 0.82 wt% Au/CeO₂ and the corresponding deconvolution, indicating the contribution of Au⁰ with a binding energy of 84.24 and 87.94 eV; (B) the Ce 3d XPS region showing the contribution mainly of Ce⁴⁺; (C) O1s XPS spectra with two different bands, at 529.41 and 531.91 eV, associated to CeO and CeOH, respectively; and (D) C1s XPS spectra, used as a charge reference having a typical binding energy of 284.8 eV corresponding to the C–C component.

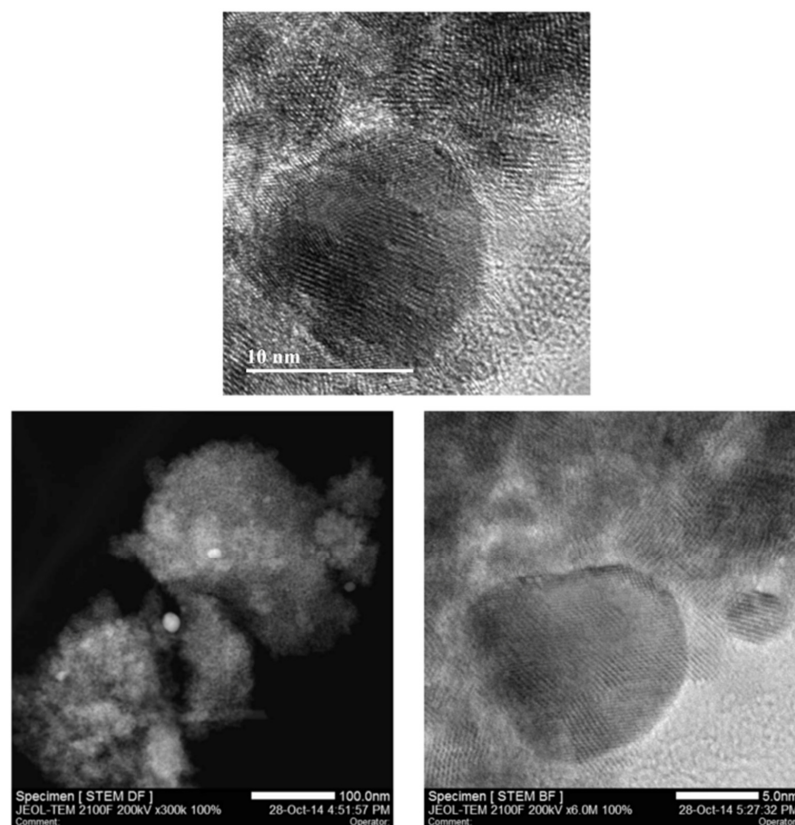


Figure 1. Representative HR-TEM (Top), dark Field (Bottom, Left) and bright Field (Bottom, Right) HR-STEM images of the 0.82% Au/CeO₂ catalyst. The high-resolution image allows one to distinguish the crystal planes corresponding to Au particles. Au element is well distributed in the particles, as observed in the bright field image.

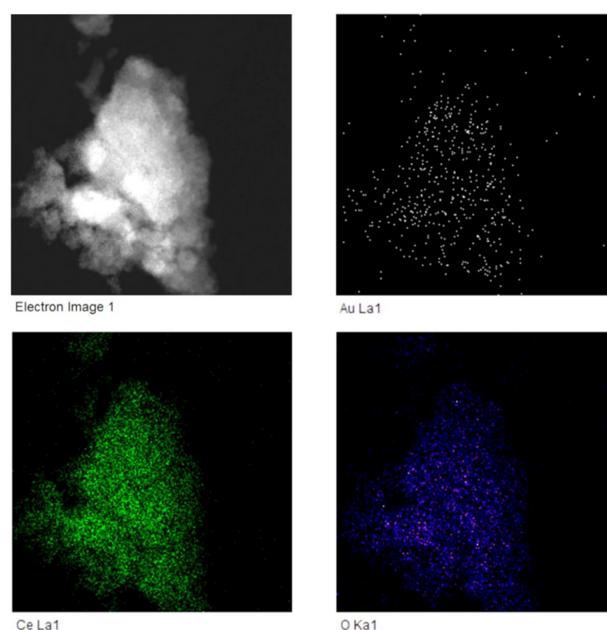


Figure 2. Dark field scanning electron microscopy of 0.82% AuCeO₂ catalyst and EDX elemental mapping of gold, cerium and oxygen demonstrating that these elements are evenly distributed in the particle.

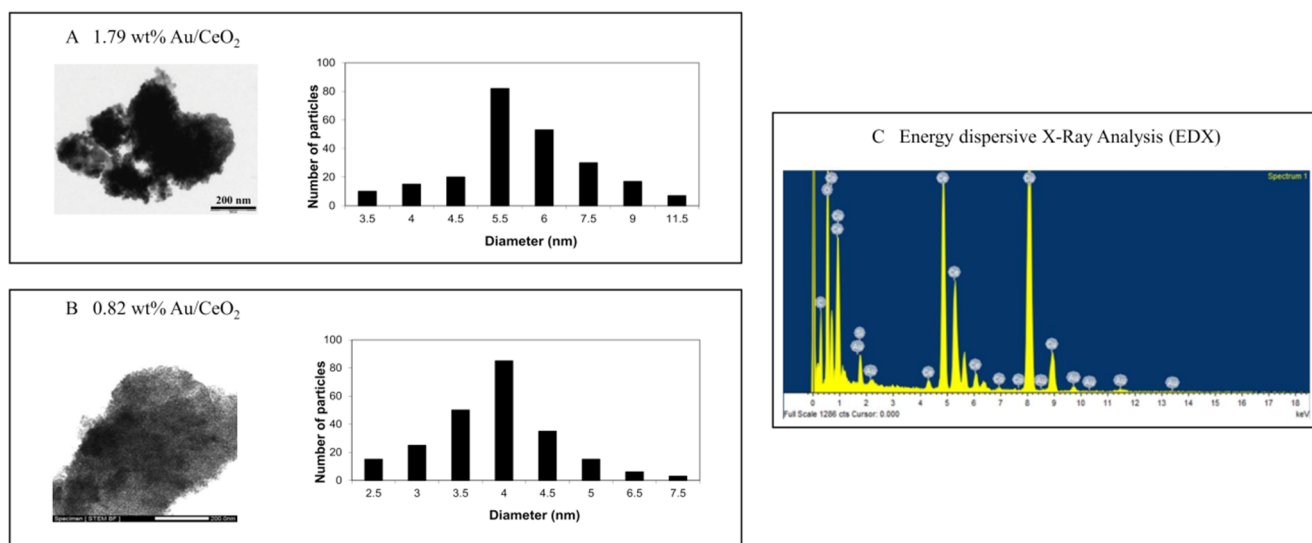


Figure 3. HR-STEM images and corresponding histograms of nanoparticle size distribution for (A) 1.79% AuCeO₂ with average diameter 6.04 nm and (B) 0.82 wt% Au/CeO₂ (B) with average diameter 3.94 nm. (C) Energy dispersive X-Ray analysis (EDX) demonstrating the presence in the particles of Au and Ce.

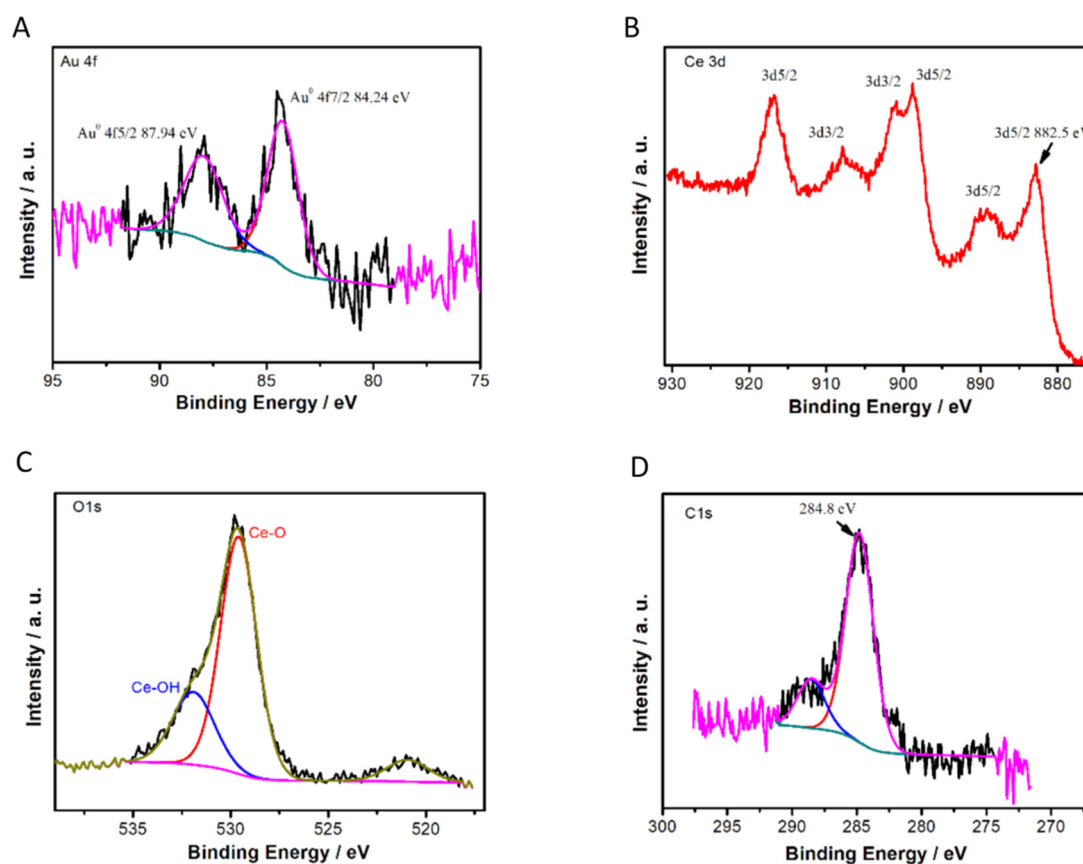


Figure 4. Experimental high resolution XPS peaks, best deconvolutions and assignments of Au 4f (A), Ce 3d (B), O1s (C) regions for a sample of 0.82% Au/CeO₂ and C1s (D) XPS spectra used as reference.

3.3. Leukocyte–Endothelium Interactions

It is known that levels of many proinflammatory markers are increased in patients with metabolic disorders. Therefore, we assessed the influence of T2D and Au/CeO₂ on the interaction of PMN with the endothelial monolayer, one of their main functions. In fact, the interaction between leukocytes to the endothelium can be the first step in the atherosclerotic process. We observed a reduction in leukocyte rolling velocity ($p < 0.001$, Figure 5A–D), and increased leukocyte adhesion ($p < 0.05$, Figure 5A–D) and rolling flux ($p < 0.01$, Figure 5A–D) in diabetic patients with respect to control individuals. Treatment with ceria NPs containing 10, 4.4 and 1.79 wt% Au did not alter these effects (Figure 5B–D). Importantly, treatment with 0.82 wt% Au/CeO₂ reversed the effect observed in leukocyte rolling velocity ($p < 0.05$, Figure 5A), rolling flux ($p < 0.05$, Figure 5A) and leukocyte adhesion ($p < 0.05$, Figure 5A). In agreement with these results, it has been demonstrated that the administration of CeO₂ nanoparticles can protect the heart from oxidative and inflammatory injury induced by the cardiac-specific expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) [33]. In line with these ideas, the possible beneficial effects for combating atherosclerosis with targeted nanomedicines has been reviewed [34].

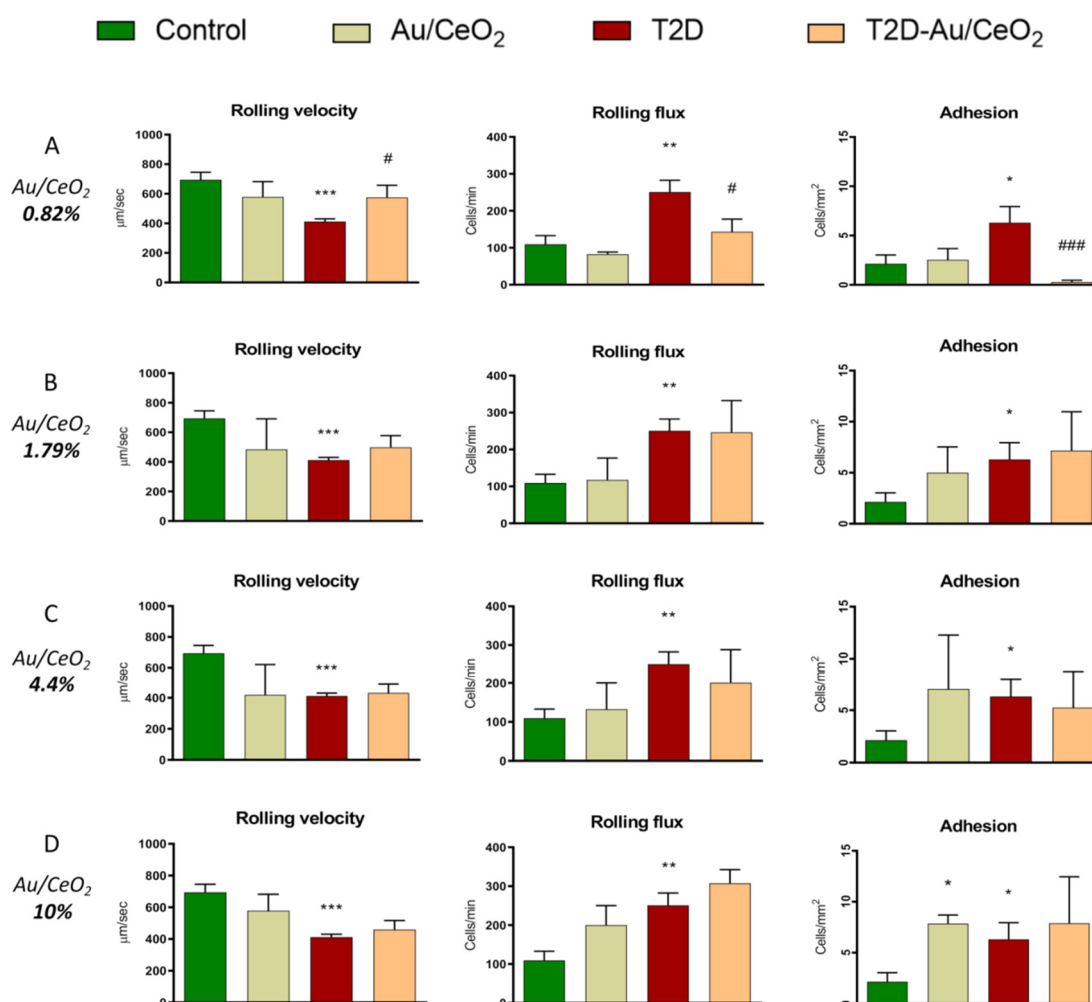


Figure 5. Evaluation of leukocyte–endothelium interaction in presence and absence of Au/CeO₂ (3 h, 0.02 mg/mL) in T2D patients and control subjects. Rolling velocity (µm second^{−1}), rolling flux (leukocytes per minute) and adhesion (leukocytes per square millimetre). * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.01$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.05$ vs. DM2; ### $p < 0.001$ vs. DM2.

Given that the effect of these particles on the leukocyte–endothelium interaction was only observed with 0.82 wt% Au, and that NPs with a higher proportion of Au (1.79, 4.4 or

10%) lacked an effect, we carried out the remaining experiments with 0.82 wt% Au. It is known that Au loading determines the activity of Au/CeO₂ as a catalyst. On the one hand, higher Au loadings should increase the number of sites. On the other hand, high loadings increase the Au average particle size, decreasing the catalytic activity. Due to these opposite effects, an optimal Au loading in the range from 0.1 to 2 wt% is frequently observed. In the present case, it seems that the performance of Au (0.82 wt%)/CeO₂ is better than the Au (1.79 wt%)/CeO₂ at higher Au loading. We can also speculate that particles with different amounts of Au penetrate the cellular membranes to a varying extent, thus modulating their biological activity. In fact, it is important to highlight the importance of size-dependent cytoprotective effects of nanoparticles, as it has been recently described [35]. In this study, they demonstrate that selenium nanoparticles (SeNPs) with a diameter of 100 nm have a more pronounced cytoprotective effect on the cells of the cerebral cortex under conditions of ischaemia/reoxygenation (OGD/R) through an increased baseline and an OGD/R-induced expression of genes encoding protective proteins, suppression of the OGD-induced global increase in [Ca²⁺]_i and activation of reactive astrogliosis. Whereas 50 nm-sized and 400 nm-sized SeNPs, while also exerting a protective effect, do not eliminate the OGD-induced hyperexcitation of neurons. They conclude that one of the explanations for this difference in the effectiveness of the cytoprotective action of different-sized SeNPs is the presence of two endocytosis pathways for large SeNPs (100 and 400 nm) and the presence of some toxic effects in 50 nm-sized SeNPs.

To further explore interactions between leukocytes and endothelial cells, we performed a static interaction assay (Figure 6). Data showed a significant increase in leukocyte adhesion when HUVEC were stimulated with TNF- α (5 ng/mL) ($p < 0.01$). DMSO did not alter leukocyte adhesion in unstimulated or stimulated HUVEC. Interestingly, treatment with 0.82 wt% Au/CeO₂ nanoparticles (0.02 mg/mL for 3 h) reversed TNF- α -induced adhesion (Figure 6), resulting in values similar to those of unstimulated cells.

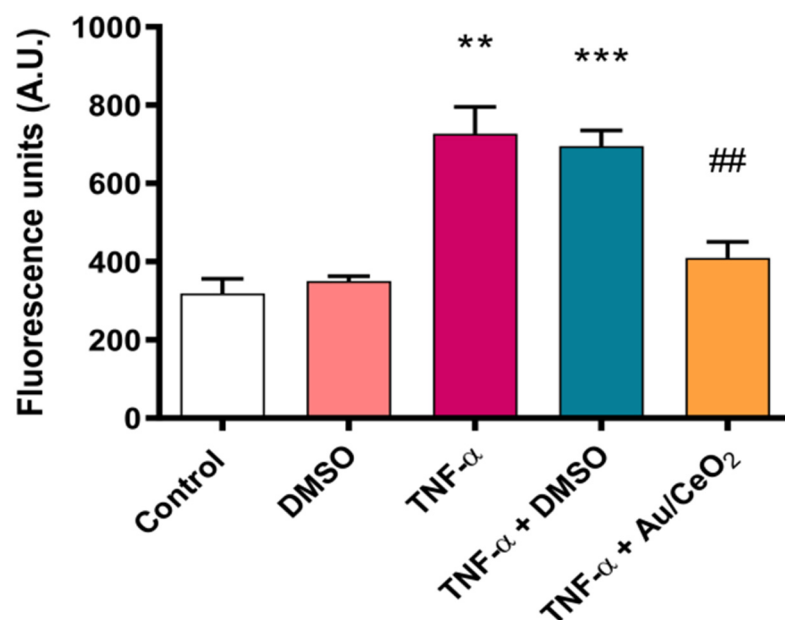


Figure 6. Au/CeO₂ (3 h, 0.02 mg/mL) effects in leukocyte adhesion to HUVEC monolayer stimulated with TNF- α (5 ng/mL). ** $p < 0.01$ vs. not stimulated; *** $p < 0.001$ vs. not stimulated; ## $p < 0.01$ vs. stimulated.

3.4. Biocompatibility of Au/CeO₂

When exploring the effects of an antioxidant agent, it is crucial to assess its biocompatibility. This is particularly important in the case of Au/CeO₂, which is a catalyst with strong oxidation activity. However, it should be reminded that the remarkable catalytic activity is

observed in the presence of oxygen at atmospheric or higher pressure and frequently upon heating. Since the reaction rate is first order with respect to oxygen pressure, this catalytic activity should be very attenuated under the present conditions. For the biocompatibility study, we used the U937 cell line (human monocytes) to evaluate the following parameters: (i) cell viability, (ii) proliferation and (iii) induction of apoptosis. Regarding the viability and proliferation assay, cells treated with DMSO or 0.82 wt% Au/CeO₂ demonstrated a similar multiplication rate to that of untreated cells, maintaining the same percentages of proliferation (Figure 7A). Viability was not affected by any of the treatments (Figure 7B).

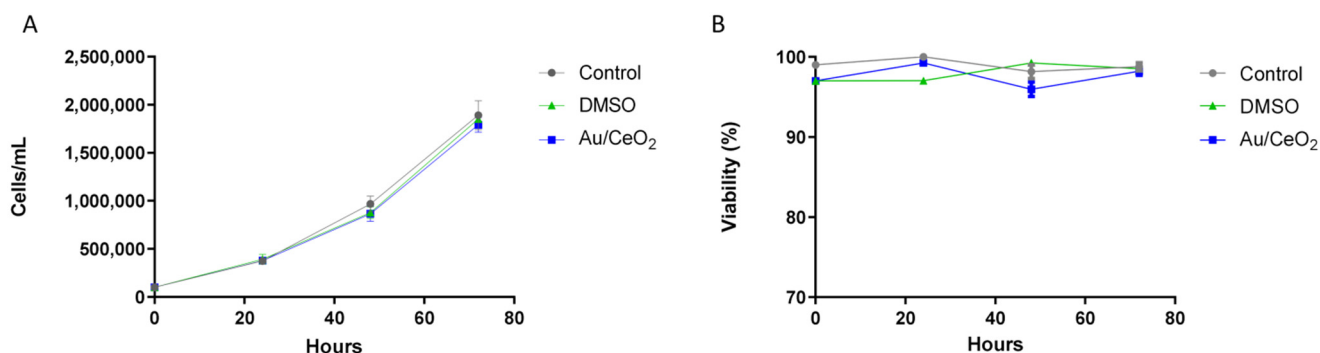


Figure 7. Determination of cellular proliferation and viability. Effect of Au/CeO₂ and its vehicle DMSO on U937 cell line. (A) Cell count over 3 days revealed no difference in cellular proliferation between each condition over the course of the experiment (72 h). (B) Cell viability assessed with acridine orange and propidium iodide double stain.

These results were confirmed by specifically studying apoptosis performing an Annexin V and propidium iodide bivariate assay (Figure 8). We evaluated four different cellular subpopulations: Vital (AnnV−/PI−), apoptotic (AnnV+/PI−), late apoptotic (AnnV−/PI+) and necrotic (AnnV+/PI+). Nearly 85% of the STS treated cells displayed apoptotic features: compared to 15% of negative control (untreated cells). The portion of apoptotic cells in the vehicle and Au/CeO₂ were similar (16.2% and 17.4%, respectively) (Figure 8A,B) and demonstrated no difference when compared to untreated cells. These results revealed no increase in the proportion of apoptotic or necrotic cells due to the treatment of any of the particles analysed (Figure 8C).

Therefore, our cell toxicity analysis has revealed that 0.82 wt% Au NPs do not compromise cell viability. This is in line with previously published data demonstrating that Au-supported CeO₂ NPs possess a high degree of biocompatibility with RAW 264.7 macrophage cells [36]. Furthermore, and in agreement with these results, the lack of apoptosis induction in HeLa cells incubated with the NPs by studying nuclear morphology has been demonstrated, i.e., chromatin condensation and nuclear fragmentation, which are two typical apoptotic features [22].

3.5. ROS Production and Levels of NF-κB (p65)

Multiple targets could be proposed to mediate the antioxidant and anti-inflammatory effects of gold, ceria and Au-coated ceria NPs on the leukocyte–endothelium system. CeO₂ NPs have been reported to reduce the production of ROS and suppress iNOS protein levels in stimulated macrophages [37], and to diminish mRNA levels of several inflammatory markers including IL-8, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) in human aortic endothelial cells (HAECs) [38].

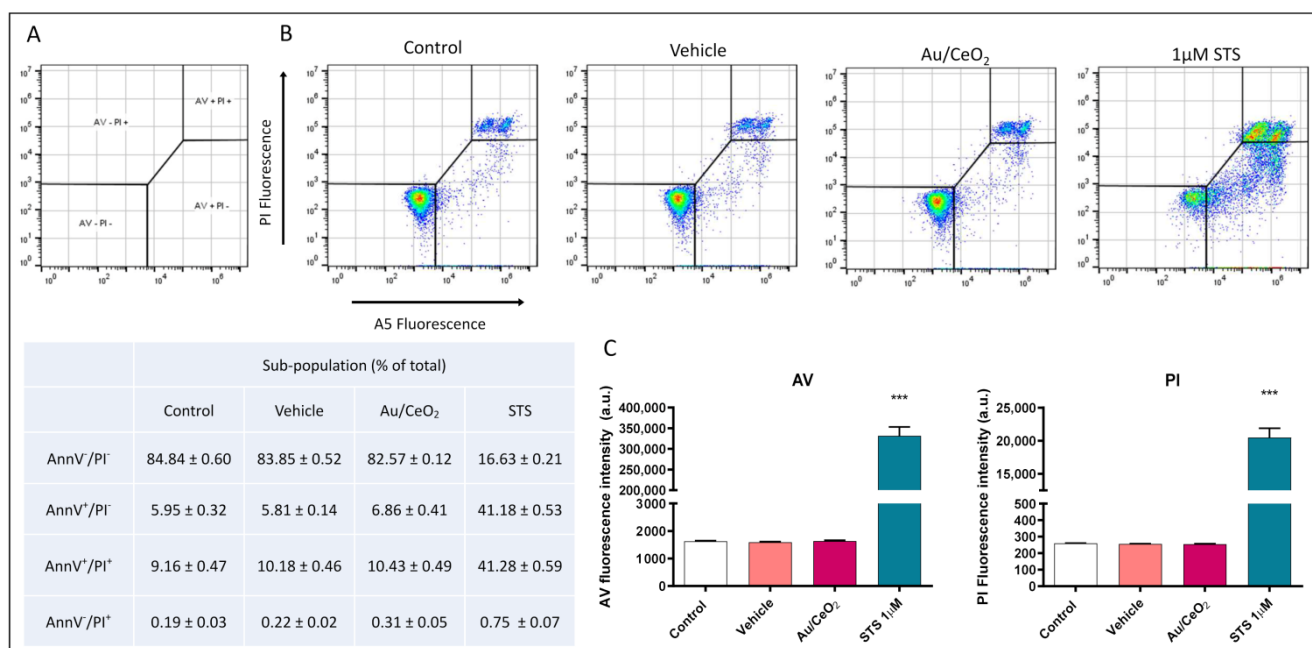


Figure 8. Assessment of apoptosis in U937 cells. (A) Diagram of the gating showing all the populations for each histogram. (B) Representative histograms (Bivariate Annexin V/PI analysis) of untreated cells, vehicle (DMSO), Au/CeO₂ treatment and positive apoptotic control (1 µM STS) demonstrating the existence of 4 cellular sub-populations: AnnV⁻/PI⁻, AnnV⁺/PI⁻, AnnV⁻/PI⁺ and AnnV⁺/PI⁺. Table shows the percentage of each sub-population for every condition studied (Mean + SEM). (C) Summary of Annexin V and PI fluorescence data. Data (mean + SEM) were analysed by Student's *t* test. Significance *** *p* < 0.001 vs. Untreated.

ROS can play a key role in hyperglycaemia-mediated endothelial impairment and vascular complications associated to insulin resistance and T2D [39,40]. In fact, it has been demonstrated that T2D patients have an enhanced risk of developing cardiovascular events, which is probably related to mitochondrial ROS production and oxidative stress [31]. We examined ROS levels by means of fluorescence and observed that leukocytes from T2D patients displayed a higher amount of ROS compared to those from control subjects (*p* < 0.05) (Figure 9A). In addition, the treatment with Au/CeO₂ containing 0.82 wt% Au significantly reduced ROS levels (*p* < 0.05) (Figure 9A), pointing to a beneficial antioxidant effect in T2D. In line with our findings, the antioxidant capacity of Au/CeO₂ has been previously described in HeLa cells [41].

T2D is related to inflammation and, therefore, to proinflammatory cytokines [42]. In fact, it has been demonstrated that T2D increases NF-κB in leukocytes, highlighting the importance of this transcription factor [43]. In this sense, we examined the early cellular immune response by analysing the protein expression of NF-κB (subunit p65). HUVEC incubated with PMN from T2D patients displayed an increased amount of p65 compared to those incubated with PMN from control subjects (*p* < 0.05) (Figure 9B,C). Moreover, treatment with Au/CeO₂ containing 0.82 wt% Au significantly reduced the rise in NF-κB (p65) expression (*p* < 0.05) (Figure 9B,C), suggesting a protective anti-inflammatory effect of Au/CeO₂ NP. In agreement with these results, it has been described that AuNPs can ameliorate muscle atrophy by reducing hyperglycaemia, inflammation and oxidative stress, and by suppressing the ubiquitin-proteasome proteolytic process in an animal model of diabetes [44]. In this sense, it has been demonstrated that other antioxidant compounds, such as MitoQ [45] or MitoTempoL, can protect leukocytes and pancreatic β-cells against oxidative stress by decreasing NF-κB activity and promoting their survival in T2D [46].

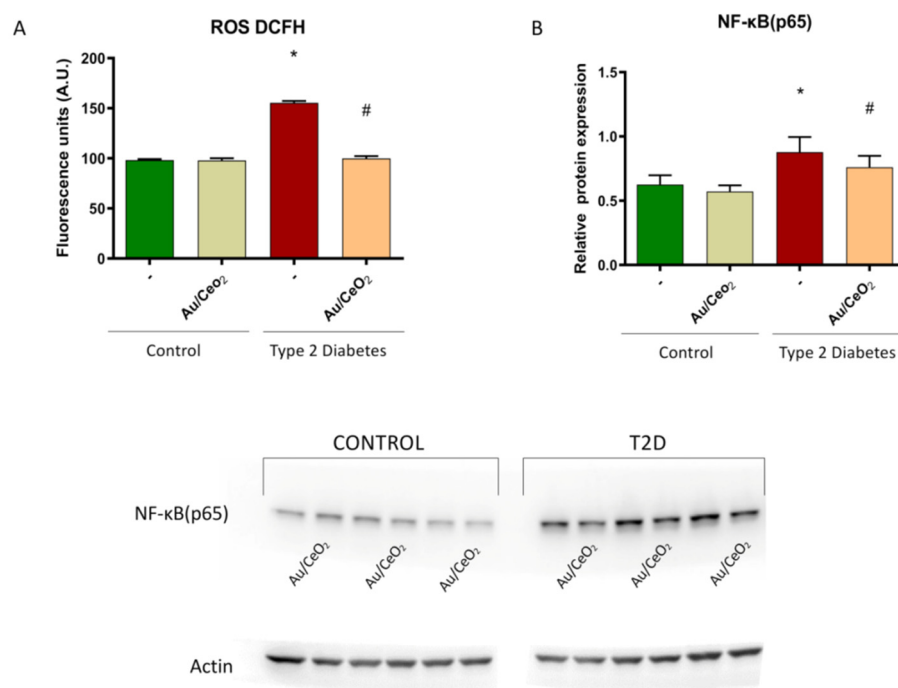


Figure 9. (A) ROS production evaluated by DCFH-DA, (B) levels of NF-κB (p65) treated or not with Au/CeO₂ (3 h, 0.02 mg/mL) in leukocytes from type 2 diabetic patients and control subjects and (C) representative WB image. * $p < 0.05$ vs. control group. # $p < 0.05$ vs. T2D group (original WB are shown in Supplementary Figure S1).

4. Conclusions

In the present study, we demonstrate a beneficial role of Au/CeO₂ 0.82% nanoparticles in T2D, especially by decreasing leukocytes/endothelium interactions. In general, we suggest that oxidative stress and increased inflammation, together with NF-κB activation, contribute to the enhanced interactions between these cells, which in turn increase the risk of cardiovascular diseases. Importantly, we demonstrate that Au/CeO₂ 0.82% are biocompatible, and modulate these actions, thus decreasing ROS production and NF-κB, which endorses the beneficial effects of this compound in preventing cardiovascular diseases in T2D.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11112297/s1>, Supplementary File includes information about Zeta potential, Figure S1: Original WB pictures.

Author Contributions: Conceptualisation, M.R., H.G. and V.M.V.; methodology, A.G. and S.L.-D.; validation, S.R.-L. and M.M., formal analysis, P.D.-P. and F.C.; investigation, P.D.-P., F.C., A.G., N.A., C.L.-M. and S.R.-L.; resources, C.M., M.R., H.G. and V.M.V.; data curation, P.D.-P., J.R.H., N.A. and S.R.-L.; writing—original draft preparation, P.D.-P., F.C., M.R. and V.M.V.; writing—review and editing, S.L.-D., J.R.H. and N.A.; visualisation, M.M.; supervision, C.L.-M.; project administration, H.G. and V.M.V.; funding acquisition, C.L.-M., M.R., H.G. and V.M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed by grants PI22/00424, PI19/00838, PI19/0437 and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute and by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”); ACIF/2020/370 (P.D.-P.), GRISOLIAP/2019/091 (F.C.) and APOSTD/2020/145 (S.L.-D); S.R.-L. is recipient of a Maria Zambrano fellowship ZA21-049, from the requalification of the Spanish university system from the Ministry of Universities of the Government of Spain, financed by the European Union, Next Generation EU, PROMETEO/2019/027 by the Ministry of Health of the Valencian Regional Government. C.L.-M. was supported by Erasmus+ internship grant through Uppsala University, Sweden.

Institutional Review Board Statement: The study was approved from the Hospital's Ethics Committee (CEIC 98/19) and was performed in compliance with the statement of ethical principles for medical research of the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data are contained within this article and Supplementary Files.

Acknowledgments: We thank Rosa Falcón for her technical assistance and Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance.

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

References

1. Zimmet, P.; Alberti, K.G.M.M.; Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **2001**, *414*, 782–787. [\[CrossRef\]](#)
2. Engelmann, J.; Manuwald, U.; Rubach, C.; Kugler, J.; Birkenfeld, A.L.; Hanefeld, M.; Rothe, U. Determinants of mortality in patients with type 2 diabetes: A review. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2016**, *17*, 129–137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Katsiki, N.; Purrello, F.; Tsioufis, C.; Mikhailidis, D.P. Cardiovascular disease prevention strategies for type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin. Pharmacother.* **2017**, *18*, 1243–1260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Szendroedi, J.; Phielix, E.; Roden, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *8*, 92–103. [\[CrossRef\]](#)
5. Yazıcı, D.; Sezer, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *960*, 277–304. [\[CrossRef\]](#)
6. Rocha, M.; Apostolova, N.; Diaz-Rua, R.; Muntane, J.; Victor, V.M. Mitochondria and T2D: Role of Autophagy, ER Stress, and Inflammasome. *Trends Endocrinol. Metab.* **2020**, *31*, 725–741. [\[CrossRef\]](#)
7. Barzilay, J.I.; Abraham, L.; Heckbert, S.R.; Cushman, M.; Kuller, L.H.; Resnick, H.E.; Tracy, R.P. The Relation of Markers of Inflammation to the Development of Glucose Disorders in the Elderly. *Diabetes* **2001**, *50*, 2384–2389. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Duncan, B.B.; Schmidt, M.I.; Pankow, J.S.; Ballantyne, C.M.; Couper, D.; Vigo, A.; Hoogeveen, R.; Folsom, A.R.; Heiss, G. Low-Grade Systemic Inflammation and the Development of Type 2 Diabetes. *Diabetes* **2003**, *52*, 1799–1805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Yi, B.; Hu, X.; Zhang, H.; Huang, J.; Liu, J.; Hu, J.; Li, W.; Huang, L. Nuclear NF- κ B p65 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Correlates with Urinary MCP-1, RANTES and the Severity of Type 2 Diabetic Nephropathy. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Tousoulis, D.; Papageorgiou, N.; Androulakis, E.; Siasos, G.; Latsios, G.; Tentolouris, K.; Stefanadis, C. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: Novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *62*, 667–676. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Shi, J.; Kantoff, P.W.; Wooster, R.; Farokhzad, O.C. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 20–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Huang, Y.; Fan, C.-Q.; Dong, H.; Wang, S.-M.; Yang, X.-C.; Yang, S.-M. Current applications and future prospects of nanomaterials in tumor therapy. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 1815–1825. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Martín, R.; Menchón, C.; Apostolova, N.; Víctor, V.M.; Álvaro, M.; Herance, J.R.; García, H. Nano-Jewels in Biology. Gold and Platinum on Diamond Nanoparticles as Antioxidant Systems Against Cellular Oxidative Stress. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6957–6965. [\[CrossRef\]](#)
14. Diab, M.S.; Dkhil, M.A.; Bauomy, A.A.; Al-Quraishy, S. Antioxidant and hepatoprotective role of gold nanoparticles against murine hepatic schistosomiasis. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 7467–7475. [\[CrossRef\]](#)
15. Charbgo, F.; Bin Ahmad, M.; Darroudi, M. Cerium oxide nanoparticles: Green synthesis and biological applications. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 1401–1413. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Esch, F.; Fabris, S.; Zhou, L.; Montini, T.; Africh, C.; Fornasiero, P.; Comelli, G.; Rosei, R. Electron Localization Determines Defect Formation on Ceria Substrates. *Science* **2005**, *309*, 752–755. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Turner, S.; Lazar, S.; Freitag, B.; Egoavil, R.; Verbeeck, J.; Put, S.; Strauven, Y.; Van Tendeloo, G. High resolution mapping of surface reduction in ceria nanoparticles. *Nanoscale* **2011**, *3*, 3385–3390. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Nelson, B.C.; Johnson, M.E.; Walker, M.L.; Riley, K.R.; Sims, C.M. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants* **2016**, *5*, 15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Herance, J.R.; García, H.; Gutiérrez-Carcedo, P.; Navalón, S.; Pineda-Lucena, A.; Palomino-Schätzlein, M. A translational approach to assess the metabolomic impact of stabilized gold nanoparticles by NMR spectroscopy. *Analyst* **2018**, *144*, 1265–1274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Bhagat, S.; Vallabani, N.V.S.; Shutthanandan, V.; Bowden, M.; Karakoti, A.S.; Singh, S. Gold core/ceria shell-based redox active nanozyme mimicking the biological multienzyme complex phenomenon. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *513*, 831–842. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C.W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–668. [\[CrossRef\]](#)

22. Menchón, C.; Martín, R.; Apostolova, N.; Victor, V.M.; Álvaro, M.; Herance, J.R.; García, H. Gold Nanoparticles Supported on Nanoparticulate Ceria as a Powerful Agent against Intracellular Oxidative Stress. *Small* **2012**, *8*, 1895–1903. [\[CrossRef\]](#)
23. Versiani, A.F.; Andrade, L.M.; Martins, E.M.; Scalzo, S.; Geraldo, J.M.; Chaves, C.R.; Ferreira, D.C.; Ladeira, M.; Guatimosim, S.; Ladeira, L.O.; et al. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. *Future Virol.* **2016**, *11*, 293–309. [\[CrossRef\]](#)
24. Mahmoudi, F.; Mahmoudi, F.; Gollo, K.H.; Amini, M.M. Novel Gold Nanoparticles: Green Synthesis with Eryngium thyrsoideum Boiss Extract, Characterization, and In Vivo Investigations on Inflammatory Gene Expression and Biochemical Parameters in Type 2 Diabetic Rats. *Biol. Trace Element Res.* **2021**, *200*, 2223–2232. [\[CrossRef\]](#)
25. Ponnaiyandurai, M.; Rajeshkumar, S.; Vanaja, M.; Annadurai, G. In Vivo Type 2 Diabetes and Wound-Healing Effects of Antioxidant Gold Nanoparticles Synthesized Using the Insulin Plant Chamaecostus cuspidatus in Albino Rats. *Can. J. Diabetes* **2019**, *43*, 82–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Alenazi, F.; Saleem, M.; Khaja, A.S.S.; Zafar, M.; Alharbi, M.S.; Al Hagbani, T.; Ashraf, J.M.; Qamar, M.; Rafi, Z.; Ahmad, S. Metformin encapsulated gold nanoparticles (MTF-GNPs): A promising antiglycation agent. *Cell Biochem. Funct.* **2022**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Khan, S.; Wang, C.H. ER stress in adipocytes and insulin resistance: Mechanisms and significance (Review). *Mol. Med. Rep.* **2014**, *10*, 2234–2240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Ozcan, U.; Cao, Q.; Yilmaz, E.; Lee, A.-H.; Iwakoshi, N.N.; Özdelen, E.; Tuncman, G.; Görgün, C.; Glimcher, L.H.; Hotamisligil, G.S. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* **2004**, *306*, 457–461. [\[CrossRef\]](#)
29. Yakimovich, N.O.; Ezhevskii, A.A.; Guseinov, D.V.; Smirnova, L.A.; Gracheva, T.A.; Klychkov, K.S. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **2008**, *57*, 520–523. [\[CrossRef\]](#)
30. Barath ManiKanth, S.; Kalishwaralal, K.; Sriram, M.; Pandian, S.R.K.; Youn, H.-S.; Eom, S.; Gurunathan, S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J. Nanobiotechnol.* **2010**, *8*, 16. [\[CrossRef\]](#)
31. Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Bellod, L.; de Pablo, C.; Alvarez, A.; Roldan-Torres, I.; Sola-Izquierdo, E.; Victor, V.M. Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions and Mitochondrial Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients and Their Association With Silent Myocardial Ischemia. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1695–1702. [\[CrossRef\]](#)
32. Kiely, J.-M.; Lusinskas, F.W.; Gimbrone, M.A., Jr. Leukocyte-Endothelial Monolayer Adhesion Assay (Static Conditions). *Methods Mol. Biol.* **1999**, *96*, 131–136. [\[CrossRef\]](#)
33. Niu, J.; Azfer, A.; Wang, K.; Wang, X.; Kolattukudy, P.E. Cardiac-Targeted Expression of Soluble Fas Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *328*, 740–748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Nakhband, A.; Eskandani, M.; Omid, Y.; Saeedi, N.; Ghaffari, S.; Barar, J.; Garjani, A. Combating atherosclerosis with targeted nanomedicines: Recent advances and future prospective. *BioImpacts* **2018**, *8*, 59–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Varlamova, E.G.; Gudkov, S.V.; Plotnikov, E.Y.; Turovsky, E.A. Size-Dependent Cytoprotective Effects of Selenium Nanoparticles during Oxygen-Glucose Deprivation in Brain Cortical Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7464. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Chen, B.-H.; Babu, K.S.; Anandkumar, M.; Tsai, T.; Kao, T.; Inbaraj, B.S. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 5515–5531. [\[CrossRef\]](#)
37. Hirst, S.M.; Karakoti, A.S.; Tyler, R.D.; Sriranganathan, N.; Seal, S.; Reilly, C.M. Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Small* **2009**, *5*, 2848–2856. [\[CrossRef\]](#)
38. Gojova, A.; Lee, J.-T.; Jung, H.S.; Guo, B.; Barakat, A.I.; Kennedy, I.M. Effect of cerium oxide nanoparticles on inflammation in vascular endothelial cells. *Inhal. Toxicol.* **2009**, *21* (Suppl. S1), 123–130. [\[CrossRef\]](#)
39. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1058–1070. [\[CrossRef\]](#)
40. Contreras, C.; Sanchez, A. Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2014**, *12*, 412–426. [\[CrossRef\]](#)
41. Gutiérrez-Carcedo, P.; Navalón, S.; Simó, R.; Setoain, X.; Aparicio-Gómez, C.; Abasolo, I.; Victor, V.M.; García, H.; Herance, J.R. Alteration of the Mitochondrial Effects of Ceria Nanoparticles by Gold: An Approach for the Mitochondrial Modulation of Cells Based on Nanomedicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 744. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Mezzano, S.; Aros, C.; Droguett, A.; Burgos, M.E.; Ardiles, L.; Flores, C.; Schneider, H.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2004**, *19*, 2505–2512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Bajpai, A.; Tilley, D.G. The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1547. [\[CrossRef\]](#)
44. Al-Shwaheen, A.; Aljabali, A.A.; Alomari, G.; Al Zoubi, M.; Alshaer, W.; Al-Trad, B.; Tambuwala, M.M. Molecular and cellular effects of gold nanoparticles treatment in experimental diabetic myopathy. *Heliyon* **2022**, *8*, e10358. [\[CrossRef\]](#)
45. Escribano-Lopez, I.; Diaz-Morales, N.; Rovira-Llopis, S.; de Marañon, A.M.; Orden, S.; Alvarez, A.; Bañuls, C.; Rocha, M.; Murphy, M.P.; Hernandez-Mijares, A.; et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 200–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Lim, S.; Rashid, A.; Jang, M.; Kim, Y.; Won, H.; Lee, J.; Woo, J.-T.; Kim, Y.S.; Murphy, M.P.; Ali, L.; et al. Mitochondria-targeted Antioxidants Protect Pancreatic β -cells against Oxidative Stress and Improve Insulin Secretion in Glucotoxicity and Glucolipotoxicity. *Cell. Physiol. Biochem.* **2011**, *28*, 873–886. [\[CrossRef\]](#)

9 ANEXO II: PUBLICACIONES

Título: Metformin modulates mitochondrial function and mitophagy in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients

Autores: Aranzazu M. de Marañón, Pedro Díaz-Pozo, Francisco Canet, Noelia Díaz-Morales, Zaida Abad-Jiménez, Sandra López-Domènech, Teresa Vezza, Nadezda Apostolova, Carlos Morillas, Milagros Rocha, Víctor M. Víctor.

Revista: Redox Biology

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102342>



Metformin modulates mitochondrial function and mitophagy in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients

Aranzazu M. de Marañón^{a,1}, Pedro Díaz-Pozo^{a,1}, Francisco Canet^a, Noelia Díaz-Morales^a, Zaida Abad-Jiménez^a, Sandra López-Domènech^a, Teresa Vezza^a, Nadezda Apostolova^{b,c}, Carlos Morillas^a, Milagros Rocha^{a,b,**}, Víctor M. Víctor^{a,b,d,*}

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

^b CIBERehd - Department of Pharmacology, University of Valencia, Valencia, Spain

^c Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Metformin

Mitochondria

Mitophagy

Type 2 diabetes

ABSTRACT

Type 2 diabetes is a chronic metabolic disease that affects mitochondrial function. In this context, the rescue mechanisms of mitochondrial health, such as mitophagy and mitochondrial biogenesis, are of crucial importance. The gold standard for the treatment of type 2 diabetes is metformin, which has a beneficial impact on the mitochondrial metabolism. In this study, we set out to describe the effect of metformin treatment on mitochondrial function and mitophagy in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from type 2 diabetic patients. We performed a preliminary cross-sectional observational study complying with CONSORT requirements, for which we recruited 242 subjects, divided into 101 healthy volunteers, 93 metformin-treated type 2 diabetic patients and 48 non-metformin-treated type 2 diabetic patients. Mitochondria from the type 2 diabetic patients not treated with metformin displayed more reactive oxygen species (ROS) than those from healthy or metformin-treated subjects. Protein expression of the electron transport chain (ETC) complexes was lower in PBMCs from type 2 diabetic patients without metformin treatment than in those from the other two groups. Mitophagy was altered in type 2 diabetic patients, evident in a decrease in the protein levels of PINK1 and Parkin in parallel to that of the mitochondrial biogenesis protein PGC1 α , both of which effects were reversed by metformin. Analysis of AMPK phosphorylation revealed that its activation was decreased in the PBMCs of type 2 diabetic patients, an effect which was reversed, once again, by metformin. In addition, there was an increase in the serum levels of TNF α and IL-6 in type 2 diabetic patients and this was reversed with metformin treatment. These results demonstrate that metformin improves mitochondrial function, restores the levels of ETC complexes, and enhances AMPK activation and mitophagy, suggesting beneficial clinical implications in the treatment of type 2 diabetes.

1. Introduction

Type 2 diabetes, which is characterized by hyperglycaemia and hyperinsulinemia, is the most prevalent metabolic disease worldwide [1, 2]. At the cellular level, these homeostatic deregulations trigger cellular stress and mitochondrial dysfunction [3,4]. The hallmarks of mitochondrial dysfunction are increased ROS production, mitochondrial

membrane depolarization and lower ATP production [5].

To prevent and reduce mitochondrial dysfunction, the cell activates coordinated processes that constitute mitochondrial quality control: mitochondrial dynamics, biogenesis and mitophagy [6,7]. Mitochondrial biogenesis is the process of synthesis of new mitochondria, which is triggered by the transcription factor PPAR-gamma co-activator 1 α (PGC1 α) after AMP-activated kinase (AMPK) activation. It activates a

* Corresponding author. FISABIO- University Hospital Doctor Peset-University of Valencia, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017, Valencia, Spain.

** Corresponding author. FISABIO- University Hospital Doctor Peset-University of Valencia, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017, Valencia, Spain.

E-mail addresses: milagros.rocha@uv.es (M. Rocha), victor.victor@uv.es (V.M. Víctor).

¹ These authors have contributed equally to this study.

transcriptional programme that includes the mitochondrial transcription factor alpha (mtTFA) [8].

Mitophagy is a type of selective autophagy that degrades old or non-functioning mitochondria that are specifically tagged and then degraded by autophagy [9]. There are different pathways that regulate mitophagy, but one of the most studied relies on PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and Parkin proteins [10]. PINK1 is an outer mitochondrial membrane protein that is continuously degraded. If phosphorylated, it is stabilised and interacts with Parkin, an E3 Ubiquitin ligase that marks mitochondria for degradation. Autophagy carriers, such as the neighbour of BRCA-1 gene protein (NBR1) or sequestosome-1 (SQSTM/p62), recognize these ubiquitinated proteins. Additionally, other carrier proteins, such as BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BNIP3L/NIX), can also trigger mitophagy induced by different stimuli [11]. Mitophagy can be upregulated by active AMPK [12,13] and the subsequent expression of PGC1 α and mitochondrial fission factor (MFF) [12].

Different hypotheses have been put forward in order to explain the molecular mechanisms that underlie the beneficial effects of metformin [14,15]. For example, it acts directly on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by entering through human organic cation transporter type 1 (hOCT1), thereby modulating inflammatory response [16,17] and regulating mitochondrial dynamics [15]. Furthermore, metformin influences mitochondrial function in type 2 diabetes [17,18]. However, how metformin regulates mitophagy in PBMCs remains to be established.

In light of the above context, we hypothesized that PBMCs from type 2 diabetic patients suffer impairment of mitophagy and hampered mitochondrial function, thus leading to the accumulation of non-functional mitochondria, and this can be prevented by metformin treatment.

2. Material and methods

2.1. Subjects

We recruited 101 healthy subjects and 141 type 2 diabetic patients from the Endocrinology and Nutrition Outpatient's Department of University Hospital Doctor Peset, in Valencia (Spain). At recruitment, 93 of the 141 type 2 diabetic patients had received metformin for at least one year, at a dose of 1700 mg/day. The study was approved by the hospital's Ethics Committee for Clinical Investigation (ID: 98/19) and complied with the principles of the Helsinki declaration, and all the patients signed an informed consent form. Type 2 diabetes was diagnosed according to the criteria of the American Diabetes Association (ADA). The following inclusion criteria were established: age between 35 and 70 years, and evolution of diabetes over a period of more than 10 years. The following exclusion criteria were established: obesity (BMI >35 wt (kg)/(height (m))²); history of cardiovascular disorders; and diagnosis of any autoimmune, infectious, haematological or malignant disease. Healthy control subjects were recruited through social media advertisements, and included individuals who were 35 years or older, living in Valencia, Spain, with no diagnosed type 2 diabetes.

2.2. Sample collection, anthropometrical and biochemical determinations

All the recruited subjects attended the Endocrinology Service of University Hospital Dr. Peset after 12 h fasting and had not taken any anti-inflammatory drug during the previous 24 h. A trained nurse obtained the anthropometrical data and extracted 30 mL of peripheral blood. BMI was calculated with the formula weight (kg)/height (m)². The biochemical parameters were obtained as explained in De Marañón et al. [15]. Information regarding the concomitant medications that the study participants were taking is included in [Supplementary Table 1](#). No statistically significant differences were found between the treated groups with respect to other current medication.

2.3. Isolation of PBMCs

PBMCs were isolated from 8 mL of EDTA-anticoagulated peripheral blood by means of an immunomagnetic method (MACSprep Leukocyte Isolation Kit, human kit, Cat. Number 130-115-169, Milteny Biotech, Germany), following the manufacturer's protocol.

2.4. Flow cytometry assay

After erythrocyte lysis with RBC Lysis Solution (MACS, Cat. number 130-094-183, Milteny Biotech, Germany), 200 μ L of human PBMCs were labeled with 5 μ L of APC-CD45 antibody (BD pharmingen APC-mouse anti human CD45. CAT number 555485 BD biosciences, NJ, USA) and 1 μ M MitoSox (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA). Fluorescence was measured in a C6 Accuri cytometer (BD Biosciences, NJ, USA) with a blue laser (488 nm) and FL3 filter (585/40 nm) (mitoSOX E_x/E_m = 510/580). 10,000 cells were analysed in each experiment, and the fluorescence registered was relativized to that of an internal control consisting of U937 cells that had undergone the same protocol.

2.5. Protein expression analysis

Whole-cell proteins were extracted from PBMCs obtained from the peripheral blood and frozen at -80°C , following the procedure explained in de Marañón et al. [15]. Proteins of interest were detected using specific blocking buffer-diluted primary and secondary antibodies (see [Supplementary Table 2](#)). Protein signals were obtained using chemiluminescence and the Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, France) imaging system. The signal of each protein was relativized to a protein pool of U937 cells. In addition, some of the membranes were cut with the guidance of a molecular weight marker in order to analyze several proteins in the same experiment.

2.6. Transmission electronic microscopy (TEM)

Whole blood (1 mL) was diluted in Karnovsky solution (1:4) and incubated for 30 min, after which the PBMCs were separated by means of the aforementioned protocol. Next, the PBMCs were washed twice, diluted in 500 μ L Karnovsky, and left for 1 h at room temperature. The sample was then stored at 4°C until it was processed for TEM. TEM staining, inclusion and ultrathin sections were performed by the Microscopy Service of the University of Valencia with the JEM -1010 microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at a magnification of 7000x and a voltage of 100 kV. The different mitochondrial shape parameters were measured with ImageJ.

2.7. Analysis of serum cytokines

Serum levels of TNF α and IL-6 were measured with a Luminex® 200 analyzer system (Austin, TX, USA) following the Milliplex® MAP Kit manufacturer's procedure (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The intra-serial and inter-serial variation coefficients were <5.0% and <20.0%, respectively.

2.8. Statistical analysis

Normal distribution of the samples was confirmed with the Kolmogorov-Smirnov test or the Shapiro-Wilk test, depending on sample size. Normally and non-normally distributed data were expressed as mean $\pm$ SD and median $\pm$ (25th-75th percentiles), respectively. One-way ANOVA and a Tukey post-hoc test were employed to compare the 3 groups. The possible influence of age, BMI or HbA1c was corrected with ANCOVA (multivariate general linear model). Differences were considered significant when $p < 0.05$, with a confidence interval of 95%. Analysis was performed with SPSS 17.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA), and GraphPad (GraphPad, La Jolla, CA, USA) was used to plot the

Table 1

Anthropometric and biochemical parameters of control subjects and type 2 diabetic patients treated or not with metformin.

	Control	T2D	T2D-metformin	Age and BMI-corrected <i>p</i> value	HbA1c% corrected <i>p</i> value
n	101	48	93		
Male%	45	47.92	55		
Age (years)	45 ± 10	60 ± 11*	60 ± 9*	—	
BMI (Kg/m ²)	24.83 ± 4.42	29.59 ± 5.31*	29.70 ± 4.62*	—	
Waist circumference (cm)	82.69 ± 13.49	100.34 ± 13.06*	102.38 ± 11.21*	*	*
Waist-Hip index	0.83 ± 0.09	0.93 ± 0.08*	0.96 ± 0.07*	*	*
SBP (mm Hg)	122 ± 20.33	142.74 ± 20.61*	139.16 ± 14.59*	*	*
DBP (mm Hg)	74.54 ± 12.07	81.58 ± 11.75*	79.33 ± 9.82*	*	*
Insulin (μUI/mL)	7.42 ± 5.18	16.58 ± 9.37*	16.37 ± 12.11*	*	*
HOMA-IR	1.67 ± 1.28	5.56 ± 4.06*	5.27 ± 4.25*	*	*
HbA _{1c} (%)	5.27 ± 0.30	7.16 ± 1.56*	6.66 ± 0.69#	*	—
Glucose (mg/dL)	89.60 ± 10.71	135.48 ± 40.53*	131.40 ± 32.87*	*	*
cholesterol (mg/dL)	194.28 ± 34.77	175.43 ± 39.77*	168.21 ± 38.56*	*	*
HDL(mg/dL)	56.15 ± 14.11	46.73 ± 12.81*	44.34 ± 10.59*	*	*
LDL(mg/dL)	118.30 ± 28.78	104.38 ± 33.53*	97.06 ± 33.54*	*	*
VLDL(mg/dL)	14.5 (11.75–23)	20.5 (15–30)*	24 (18–33.75)*	*	*
CT/HDL	3.44 ± 1.02	3.98 ± 1.19	3.94 ± 1.12	*	*
Triglycerides (mg/dL)	73 (58.5–116)	102 (76–150)*	127 (92–169.83)*	*	*
Non-HDL Cholesterol	138.12 ± 33.64	129.67 ± 36.66	123.86 ± 37.38*	*	*

Mean ± standard deviations are shown in the table for normally distributed data, while the median and the 25th and 75th quartiles are displayed for non-normally distributed data. Comparisons between groups were made with ANOVA and the Tukey post-test. Non-normally distributed data were compared with the Kolmogorov-Smirnov test. The influence of age, BMI and HbA1c was tested and corrected with the multivariate linear model correction. **p* < 0.05 vs control and †*p* < 0.05 vs type 2 diabetes.

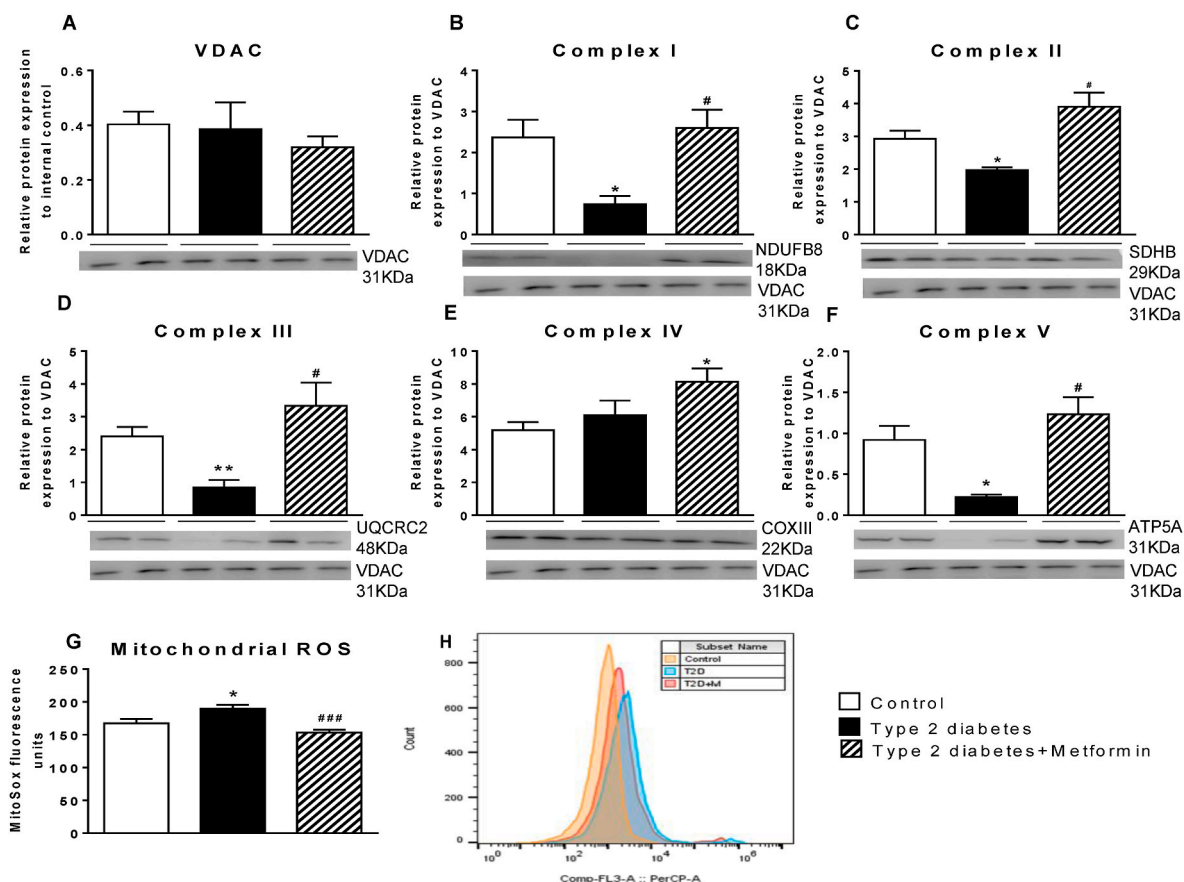


Fig. 1. Protein expression of ETC complexes and mitochondrial ROS production in type 2 diabetic patients and control subjects. (A–F). Bar graphs show measurements of the ETC complexes relativized to VDAC protein levels and to an internal control. Representative WB images are shown. Quantification was performed with at least 20 samples for each group. G) Bar graph showing the median intensity of fluorescence of MitoSOX, relative to the levels of the internal control, assessed by flow cytometry. H) Representative histogram displaying the three spectra of the analysed groups. Orange histogram represents healthy subjects, blue are type 2 diabetes patients, and red represent type 2 diabetes patients + metformin. Values represent mean ± SEM. Comparisons were made with ANOVA and a Tukey post-hoc test. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 vs Control; #*p* < 0.05 and ###*p* < 0.001 vs type 2 diabetes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

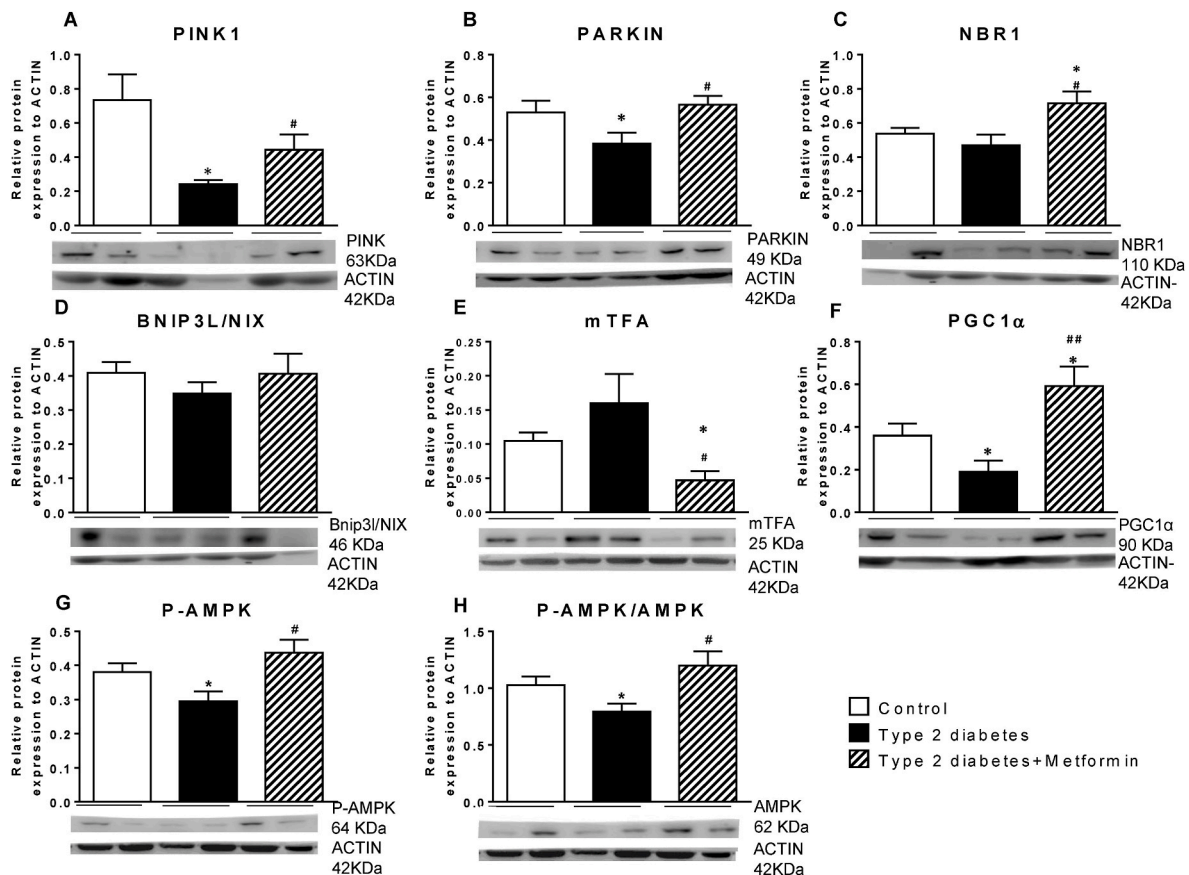


Fig. 2. Protein levels of mitophagy and mitochondrial biogenesis-related proteins in PBMCs from type 2 diabetic patients and control subjects. Protein levels relative to the actin signal of the mitophagy proteins PINK1 (A), Parkin (B), NBR1 (C) and BNIP3L/NIX (D) are shown. Mitochondrial biogenesis-related proteins mTFA and PGC1 α are shown in plots E and F, respectively. P-AMPK total and relative levels are displayed in blots G and H. Representative images of the WB experiments are shown for each assessed protein. Values in the bar charts represent mean $\pm$ SEM. Quantification was performed using at least 20 samples for each group. Comparisons were made with ANOVA and a Tukey post-hoc test. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs type 2 diabetes.

data with bar graphs to represent the media and standard error of the mean (SEM).

3. Results and discussion

3.1. Anthropometrical and biochemical parameters

First, we assessed anthropometrical measurements (Table 1), which reflected the metabolic alterations characteristic of type 2 diabetes. Regarding insulin metabolism parameters, type 2 diabetic patients showed higher levels of insulin, HOMA-IR index HbA_{1c}% and glucose than our healthy subjects. Lipid metabolism perturbations were also observed, although some were attributed to statin treatment. Previous studies have demonstrated the benefits of metformin regarding different parameters, such as levels of glucose, insulin and HOMA-IR [15,19]. In accordance with such reports, metformin treatment in our type 2 diabetic patients reduced HbA_{1c}%, thus demonstrating its capacity to decrease glycaemia and glucose-related alterations in the long term. We confirmed that age and BMI were independent factors that did not influence the rest of the data. Moreover, the differences between the groups remained when we adjusted the data for HbA_{1c}. In order to provide information regarding the concomitant medication taken at the time by the study participants, we have included a summarized table (Table 1) which shows that there were no statistical differences between type 2 diabetic patients with or without metformin treatment.

3.2. The effect of type 2 diabetes and metformin on ETC complexes and mitochondrial oxidative balance in isolated PBMCs

We assessed levels of the different ETC proteins and of a voltage-dependent anion channel (VDAC) (Fig. 1). VDAC expression did not change in any of the groups (Fig. 1A). ETC complexes, with the exception of complex IV, were affected in a similar way: their expression was reduced in PBMCs from type 2 diabetic patients (Fig. 1B–F), while in PBMCs from metformin-treated type 2 diabetic patients levels were comparable to those in healthy subjects' PBMCs (Fig. 1B–F). In accordance with these results, type 2 diabetes has been related to an impairment of mitochondrial complexes in studies with animal models [21], and in subsarcolemmal mitochondria of type 2 diabetic patients' right atrial tissue [22].

Moreover, we observed that mitochondria from PBMCs of type 2 diabetic patients had more ROS than those of control subjects, and that treatment with metformin restored mitochondrial ROS levels (Fig. 1G and H), which reflects the findings of previous research [15,20]. Importantly, excessive levels of ROS can lead to the activation of inflammatory pathways [17]. Hence, we hypothesize that metformin diminishes leukocyte activation through the reduction of ROS production and mitochondrial fission - as observed in animal studies [25] - or through AMPK activation [23,24].

The accumulation of ROS impairs mitochondrial functionality due to the generation of mtDNA mutations and the accumulation of dysfunctional and "mitophagy-resistant" mitochondria [26,27]. As a consequence, the accumulation of dysfunctional mitochondria is related to decreased insulin sensitivity and impaired β -cell insulin synthesis and

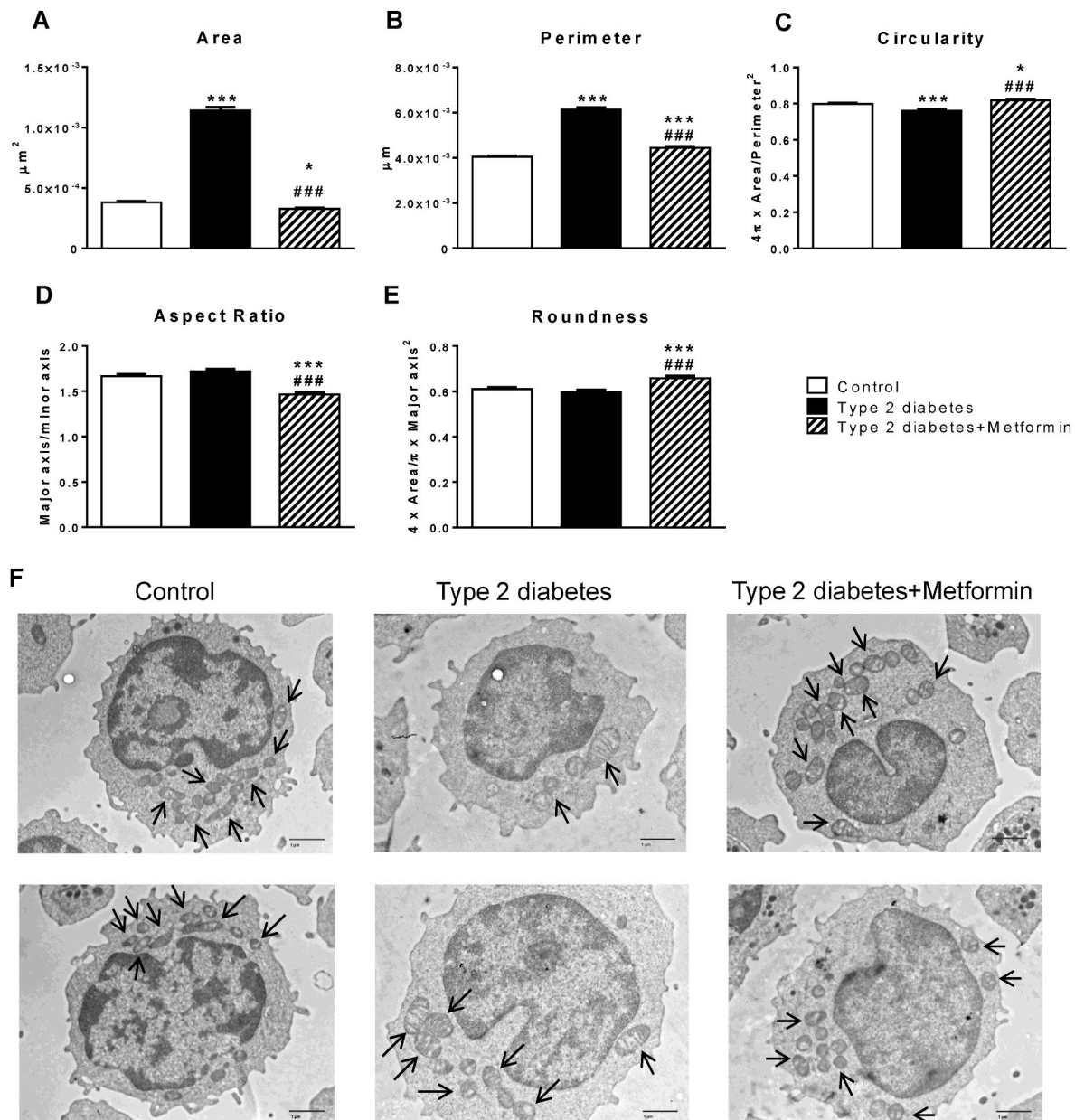


Fig. 3. Morphological analysis of mitochondria isolated from PBMCs from type 2 diabetic patients and control subjects. TEM images were analysed with ImageJ. Area (A), perimeter (B), circularity (C), aspect ratio (D) and roundness (E) were measured in at least 100 mitochondria for each group. (F) Representative images are shown below the bars. Arrows point to mitochondria characteristic of each group. Values in the bar graphs represent the mean $\pm$ SEM. Comparisons were made with ANOVA and a Tukey post-hoc test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs Control; ### $p < 0.001$ vs type 2 diabetes.

secretion [28].

3.3. Mitophagy markers are altered in PBMCs from type 2 diabetic patients and metformin reverses these effects

We next explored whether there was an impairment of mitophagy by measuring the protein expression of several markers of mitophagy and mitochondrial biogenesis (Fig. 2). The protein levels of PINK1 and Parkin (Fig. 2A, B) were reduced in PBMCs from type 2 diabetic patients. In metformin-treated patients, the expression of PINK1, Parkin and NBR1 (Fig. 2C) was significantly higher than in untreated patients. Protein levels of BNIP3L/NIX (Fig. 2D) did not differ among the three groups. In line with these data, a significant downregulation of PINK1 transcripts has been observed in skeletal muscle biopsies obtained from type 2 diabetic patients [35], and reduced mRNA expression of mitofusin 2 (MFN2), Parkin and PINK1 has been reported in patients with

diabetic neuropathy [29].

In addition, we evaluated levels of mTFA (Fig. 2E) and observed a non-significant increase of this protein's expression in type 2 diabetic patients, which was reduced by metformin treatment. Furthermore, we analysed PGC1 α and observed that its levels were markedly decreased in PBMCs from type 2 diabetic patients, while those from metformin-treated patients displayed a significant increase (Fig. 2F). A similar decrease has been observed in the *vastus lateralis* of type 2 diabetic patients when compared with controls with no family history of diabetes mellitus [30]. It is important to highlight that a decrease in the expression of PGC1 α -responsive genes involves a decrease in the expression of ETC genes [30]. Regarding the observed effect of metformin on PGC1 α expression, our results are in line with those of Aatsinki et al. [31] and Suwa et al. [32], who demonstrated that metformin increases PGC1 α protein levels and oxidative enzyme activity in hepatic and skeletal muscle, possibly via AMPK phosphorylation.

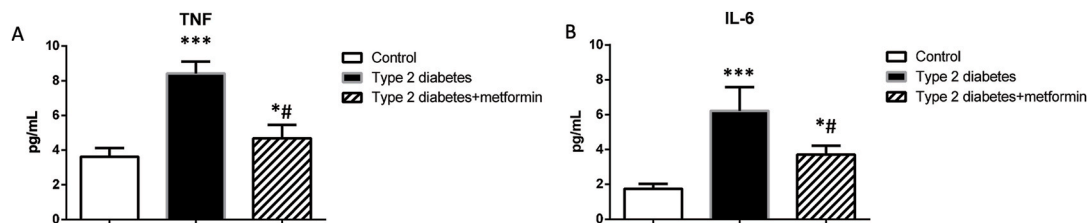


Fig. 4. Serum levels of TNF α (A) and IL-6 (B) measured with a Luminex® 200 analyzer system following the Milliplex® MAP Kit manufacturer's procedure. Comparisons were made with ANOVA and a Tukey post-hoc test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs Control; # $p < 0.05$ vs type 2 diabetes.

In order to explore this putative mechanism, we assessed the levels of total and phosphorylated AMPK (Fig. 2G and H) in PBMCs from type 2 diabetic patients and controls. Levels of both proteins were reduced in PBMCs from type 2 diabetic patients. PBMCs from metformin-treated patients presented AMPK and P-AMPK levels similar to those of healthy patients.

3.4. Metformin modulates mitochondrial morphology in PBMCs from type 2 diabetic patients

In comparison with those from healthy subjects, PBMCs from type 2 diabetics presented larger mitochondria with increased area (Fig. 3A) and perimeter (Fig. 3B), and reduced circularity (Fig. 3C). These results might appear to be in conflict with those previously reported in type 2 diabetes, which supported an increase in mitochondrial fission [15]. However, the increase in mitochondrial size can be explained by the formation of *megamitochondria*, swollen “mitophagy and fission-resistant” mitochondria that are a result of enhanced mitochondrial dysfunction [33,34]. Such altered mitochondria have been previously reported in pancreatic β cells from rats with type 2 diabetes, and also in podocytes from murine and *in vitro* models of type 2 diabetes [35,36]. Aspect ratio (Fig. 3D) and roundness (Fig. 3E), which indicate the interconnection between mitochondria, did not change significantly between our type 2 diabetic patients and controls. Metformin reversed the changes in area and perimeter and increased the roundness and circularity compared with the non-treated groups (representative TEM images of each group are shown in Fig. 3F). These features can be observed in the representative images. The beneficial effects of metformin are in line with those reported by Wang et al. [37], who demonstrated that metformin preserves mitochondrial structure in hepatocytes from high-fat diet (HFD)-fed mice.

3.5. Metformin reduces TNF α and IL-6 in type 2 diabetic patients

We next explored TNF α and IL-6, markers of the inflammatory condition in type 2 diabetes (Fig. 4), and found that the levels of both (Fig. 4 A, B) were increased in serum from type 2 diabetic patients. In metformin-treated patients, the levels of TNF α and IL-6 were significantly lower than those in subjects not receiving metformin. Given that these cytokines are proinflammatory, our findings provide further evidence of the role of inflammation in the development of type 2 diabetes. In fact, the enhanced release of TNF- α from leukocytes after activation by oxidative stress may inhibit insulin signalling and impair glucose uptake [38]. These results are in accordance with those of a previous study in which metformin treatment was associated with significantly lower levels of various pro-inflammatory cytokines in the systemic circulation of type 2 diabetic patients [39].

4. Conclusion

Our findings highlight the beneficial effects of metformin in the context of type 2 diabetes, in which it ameliorates the mitochondrial dysfunction and deregulation of mitochondrial complex levels and mitophagy that characterise this condition, avoiding, in turn, their

possible clinical implications.

Author contributions

Conceptualization: V.M.V and M.R.; Methodology, A.M.M, P.D.P., F. C., N.D.M., Z.A.J; Resources: C.M., V.M.V., M.R.; Data curation: A.M.M, P.D.P., F.C., S.L.D., V.M.V.; Writing-Original Draft: A.M.M and P.D.P.; Writing-Review and Editing: N.A., T.V., V.M.V, and M.R.; Visualization: A.M.M., P.D.P., S.L.D., and Z.A.J.; Supervision: N.A., C.M., V.M.V and R. M; Project administration: V.M.V, M.R.; Funding acquisition: V.M.V., M. R.

Technical assistance

We thank Rosa Falcón for her technical assistance and Brian Normanly (University of Valencia/CIBERehd) for his editorial assistance.

Guaranteers name

Víctor M. Víctor and Milagros Rocha.

Funding

This study was financed by grants PI19/00838, PI19/0437 and CIBERehd CB06/04/0071 by Carlos III Health Institute and by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”); UGP-15-220 by FISABIO; PROMETEO/2019/027 by Ministry of Health of the Valencian Regional Government.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interests.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102342>.

References

- [1] D.J. Magliano, R.M. Islam, E.L.M. Barr, E.W. Gregg, M.E. Pavkov, J.L. Harding, et al., Trends in incidence of total or type 2 diabetes: systematic review, *BMJ* 366 (2019 Sep 11) l5003.
- [2] X. Lin, Y. Xu, X. Pan, J. Xu, Y. Ding, X. Sun, et al., Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020 Sep 8) 14790.
- [3] B.B. Lowell, G.I. Shulman, Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes, *Science* 307 (5708) (2005 Jan 21) 384–387.
- [4] M.V. Pinti, G.K. Fink, Q.A. Hathaway, A.J. Durr, A. Kunovac, J.M. Hollander, Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 316 (2) (2019 Jan 2) E268–E285.
- [5] A. Diaz-Vegas, P. Sanchez-Aguilera, J.R. Krycer, P.E. Morales, M. Monsalves-Alvarez, M. Cifuentes, et al., Is mitochondrial dysfunction a common root of noncommunicable chronic diseases? *Endocr. Rev.* 41 (3) (2020 Jun 1) 491–517.
- [6] Q. Liang, S. Kobayashi, Mitochondrial quality control in the diabetic heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 95 (2016 Jun) 57–69.

- [7] K.-L. Lin, S.-D. Chen, K.-J. Lin, C.-W. Liou, Y.-C. Chuang, P.-W. Wang, et al., Quality matters? The involvement of mitochondrial quality control in cardiovascular disease, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021), 636295.
- [8] L. Popov, Mitochondrial biogenesis: an update, *J. Cell Mol. Med.* 24 (9) (2020 May) 4892–4899.
- [9] K. Palikaras, E. Lionaki, N. Tavernarakis, Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology, *Nat. Cell Biol.* 20 (9) (2018 Sep) 1013–1022.
- [10] A. Eiyama, K. Okamoto, PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 33 (2015 Apr) 95–101.
- [11] M. Marinković, M. Šprung, I. Novak, Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery, *Autophagy* 17 (5) (2021 May) 1232–1243.
- [12] S. Herzig, R.J. Shaw, AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2) (2018 Feb) 121–135.
- [13] R.C. Laker, J.C. Drake, R.J. Wilson, V.A. Lira, B.M. Lewellen, K.A. Ryall, et al., Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy, *Nat. Commun.* 8 (1) (2017 Sep 15) 548.
- [14] M. Foretz, B. Guigas, B. Viollet, Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.* 15 (10) (2019 Oct) 569–589.
- [15] A.M. de Marañón, F. Canet, Z. Abad-Jiménez, A. Jover, C. Morillas, M. Rocha, et al., Does metformin modulate mitochondrial dynamics and function in type 2 diabetic patients? *Antioxidants Redox Signal.* 35 (5) (2021 Aug 10) 377–385.
- [16] S. Bhansali, A. Bhansali, V. Dhawan, Metformin promotes mitophagy in mononuclear cells: a potential in vitro model for unraveling metformin's mechanism of action, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1463 (1) (2020 Mar 1) 23–36.
- [17] N. Apostolova, F. Iannantuoni, A. Gruevska, J. Muntane, M. Rocha, V.M. Victor, Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions, *Redox Biol.* 34 (2020 May 25), 101517.
- [18] S. Bhansali, A. Bhansali, P. Dutta, R. Walla, V. Dhawan, Metformin upregulates mitophagy in patients with T2DM: a randomized placebo-controlled study, *J. Cell Mol. Med.* 24 (5) (2020 Mar) 2832–2846.
- [19] M.F. van Stee, A.A. de Graaf, A.K. Groen, Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy, *Cardiovasc. Diabetol.* 17 (1) (2018 Jun 30) 94.
- [20] N. Diaz-Morales, F. Iannantuoni, I. Escribano-Lopez, C. Bañuls, S. Rovira-Llopis, E. Sola, et al., Does metformin modulate endoplasmic reticulum stress and autophagy in type 2 diabetic peripheral blood mononuclear cells? *Antioxidants Redox Signal.* 28 (17) (2018 Jun 10) 1562–1569.
- [21] T. Yokota, S. Kinugawa, K. Hirabayashi, S. Matsushima, N. Inoue, Y. Ohta, et al., Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (3) (2009 Sep 1) H1069–H1077.
- [22] T.L. Croston, D. Thapa, A.A. Holden, K.J. Tveter, S.E. Lewis, D.L. Shepherd, et al., Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307 (1) (2014 Jul 1) H54–H65.
- [23] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenik-Melody, et al., Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J. Clin. Invest.* 108 (8) (2001 Oct) 1167–1174.
- [24] J.-T. Cheng, C.-C. Huang, I.-M. Liu, T.-F. Tzeng, C.J. Chang, Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes* 55 (3) (2006 Mar) 819–825.
- [25] Q. Wang, M. Zhang, G. Torres, S. Wu, C. Ouyang, Z. Xie, et al., Metformin suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission, *Diabetes* 66 (1) (2017 Jan) 193–205.
- [26] R. Scherz-Shouval, E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, Z. Elazar, Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4, *EMBO J.* 26 (7) (2007 Apr 4) 1749–1760.
- [27] J.J. Lemasters, Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3), *Redox Biol.* 2 (2014 Jun 12) 749–754.
- [28] K.F. Petersen, D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D.L. Rothman, et al., Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance, *Science* 300 (5622) (2003 May 16) 1140–1142.
- [29] A. Czajka, S. Ajaz, L. Gnudi, C.K. Parsade, P. Jones, F. Reid, et al., Altered mitochondrial function, mitochondrial DNA and reduced metabolic flexibility in patients with diabetic nephropathy, *EBioMedicine* 2 (6) (2015 Jun 1) 499–512.
- [30] M.E. Patti, A.J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, et al., Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (14) (2003 Jul 8) 8466–8471.
- [31] S.-M. Aatsinki, M. Buler, H. Salomäki, M. Koulou, P. Pavek, J. Hakkola, Metformin induces PGC-1 α expression and selectively affects hepatic PGC-1 α functions, *Br. J. Pharmacol.* 171 (9) (2014 May) 2351–2363.
- [32] M. Suwa, T. Egashira, H. Nakano, H. Sasaki, S. Kumagai, Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 101 (6) (1985) 1685–1692, 2006 Dec.
- [33] B. Tandler, C.L. Hoppel, J.A. Mears, Morphological pathways of mitochondrial Division, *Antioxidants* 7 (2) (2018 Feb) 30.
- [34] T. Wakabayashi, Megamitochondria formation - physiology and pathology, *J. Cell Mol. Med.* 6 (4) (2002) 497–538.
- [35] C.-Y. Woo, R. Kc, M. Kim, H.S. Kim, J.Y. Baek, E.H. Koh, Autophagic flux defect in diabetic kidney disease results in megamitochondria formation in podocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521 (3) (2020 Jan 15) 660–667.
- [36] Z. Ma, T. Wirstrom, L.A.H. Borg, G. Larsson-Nyrén, I. Hals, J. Bondo-Hansen, et al., Diabetes reduces β -cell mitochondria and induces distinct morphological abnormalities, which are reproducible by high glucose in vitro with attendant dysfunction, *Islets* 4 (3) (2012 Jun) 233–242.
- [37] Y. Wang, H. An, T. Liu, C. Qin, H. Sesaki, S. Guo, et al., Metformin improves mitochondrial respiratory activity through activation of AMPK, *Cell Rep.* 29 (6) (2019 Nov) 1511–1523, e5.
- [38] F. Gonzalez, N.S. Rote, J. Minium, J.P. Kirwan, Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 336–340, 2006.
- [39] B. Amoani, S.A. Sakyi, R. Mantey, E.F. Laing, R.D. Ephraim, O. Sarfo-Katanka, S. Koffie, E. Obese, B.O. Afranie, Increased metformin dosage suppresses pro-inflammatory cytokine levels in systemic circulation and might contribute to its beneficial effects, *J. Immunoassay Immunochem.* 42 (3) (2021) 252–264.