



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Efecto de FTY720/Fingolimod sobre el desarrollo de cardiomiopatía diabética e identificación de nuevos candidatos a biomarcadores derivados del metabolismo de esfingolípidos en un modelo experimental (ratones db/db)

Elena María Goretti Diarte Añazco

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Departamento de Bioquímica y biología molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Barcelona, Septiembre 2022



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



**Efecto de FTY720/Fingolimod sobre el desarrollo de
cardiomiopatía diabética e identificación de nuevos
candidatos a biomarcadores derivados del metabolismo
de esfingolípidos en un modelo experimental
(ratones db/db)**

Elena María Goretti Diarte Añazco

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Departamento de Bioquímica y biología molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Directores:

Josep Julve Gil, PhD.

Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Francisco Blanco Vaca, MD PhD.

Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, Septiembre 2022

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y biología molecular
Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Efecto de FTY720/Fingolimod sobre el desarrollo de cardiomiopatía diabética e identificación de nuevos candidatos a biomarcadores derivados del metabolismo de esfingolípidos en un modelo experimental (ratones db/db)

Reporte presentado por Elena María Goretti Diarte Añazco para completar los requisitos de obtención del título de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Esta tesis se ha realizado en el grupo de Enfermedades relacionadas con el metabolismo de lípidos del Instituto de Investigación del Hospital de Santa Creu i Sant Pau, codirigido por el Dr. Josep Julve Gil y el Dr. Francisco Blanco Vaca

Dr. Josep Julve Gil
Investigador
Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Dr. Francisco Blanco Vaca
Servicio de Bioquímica Clínica,
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Departamento de Bioquímica y
Biología molecular. Universitat
Autònoma de Barcelona.

Elena María Goretti Diarte Añazco
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Universitat Autònoma de Barcelona.
Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Barcelona, Septiembre 2022

*En memoria de Martín Adolfo,
dedicado a Pelusia, José Tomás, Diego Martín, Carmen María y
Josías Benjamín*

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	18
ABREVIATURAS	23
RESUMEN.....	26
1. INTRODUCCIÓN.....	29
Incidencia y prevalencia de la diabetes mellitus	29
Obesidad y diabetes mellitus	31
Las complicaciones cardíacas suelen estar frecuentemente relacionadas con el desarrollo de DM	32
Patogénesis de la CMD.....	33
Modelos animales de cardiomiopatía diabética	36
Mecanismos de cardiomiopatía diabética	45
Consecuencias estructurales y funcionales relacionadas con CMD.....	51
Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD	55
Ceramidas	59
Efectos clínicos de la disfunción inducida por ceramida y la adiponectina .	68
Esfingosina 1-fosfato	70
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
Parte 1. Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD	75
Parte 2. Uso de un análogo estructural de la S1P (FTY720/Fingolimod) para el tratamiento de la CMD.....	77
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79

3.1 Animales y dietas	79
3.1.1 Métodos y procedimientos compartidos en los diferentes diseños experimentales	80
3.1.2 Modelo de prediabetes (obesidad e insulinoresistencia)	81
3.1.3 Modelo de DM2	82
3.1.3.1 Evaluación del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD	84
3.1.4 Dietas empleadas en el estudio	85
3.2 Análisis bioquímico.....	86
3.2.1 Análisis de la bioquímica plasmática.....	86
3.2.1.1 Análisis automatizado de la bioquímica plasmática	86
3.2.1.2 Análisis de insulina en plasma por técnicas ELISA.....	87
3.2.1.3 Determinación de citoquinas y adiponectina en plasma mediante un enfoque multiplex	87
3.2.2 Determinación de niveles de FTY720/Fingolimod y su forma fosforilada en plasma y miocardio de ratones db/db mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	88
3.2.3 Aislamiento de lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial.....	89
3.2.3.1 Aislamiento de la fracción de lipoproteínas no-HDL y HDL de ratón	90
3.2.3.2 Aislamiento de la fracción de LDL humana	91
3.2.3.3 Modificación de LDL humana	92
3.2.3.3a Diálisis de las LDLox en medio de cultivo	93
3.2.3.4 Marcaje de LDL con fluorocromo perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil)	93
3.2.4.4a Extracción lipídica de lipoproteínas marcadas con fluorocromo Dil y determinación mediante fluorimetría	94
3.3 Pruebas funcionales.....	95

3.3.1 Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral	95
3.3.2 Prueba de tolerancia a la insulina	95
3.3.3 Evaluación de la captación miocárdica de LDLox marcadas con fluorocromo (Dil).....	95
3.3.4 Mediciones de la funcionalidad cardíaca mediante ecocardiografía (modo M y Doppler).....	97
3.4 Análisis del perfil de lípidos y esfingolípidos mediante Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas.....	99
3.4.1 Determinación del contenido lipídico en miocardio e hígado mediante Resonancia Magnética Nuclaer (RMN).....	99
3.4.2 Determinación de los niveles de esfingolípidos circulantes en plasma, en las fracciones de colesterol HDL y no-HDL, en miocardio e hígado por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)....	100
3.5 Análisis de tejidos.....	102
3.5.1 Colección de los tejidos.....	102
3.5.2 Tinción inmunohistoquímica.....	102
3.5.3 Análisis de la expresión génica y abundancia relativa de proteínas de dianas moleculares de interés.....	103
3.5.3a Análisis de la expresión génica	103
Control de calidad del RNA	103
Transcripción inversa	103
Análisis cuantitativo de la qPCR en tiempo real.....	104
3.5.3b Análisis Western blot.....	106
3.6 Ensayos in vitro	108
3.6.1 Ensayos de citotoxicidad celular en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones simulando DM2 en presencia de concentraciones crecientes de PA y PA/OA.....	109

3.6.2 Ensayo de acumulación de vesículas lipídicas en cardiomiocitos humanos AC16.....	110
3.6.2.1 Fijación y tinción de vesículas lipídicas con Oil Red O (ORO) en cardiomiocitos humanos AC16.....	111
3.6.3 Análisis de la captación de LDLox en cardiomiocitos humanos AC16	112
3.6.4 Análisis del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación inducida por PA en cardiomiocitos humanos AC16.....	112
3.6.5 Análisis del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis inducida por PA en cardiomiocitos humanos AC16 mediante citometría de flujo ...	113
3.7 Análisis estadístico	115
4. RESULTADOS.....	116
4.1 Evaluación de modelos animales de CMD.....	116
4.1.1 Parámetros corporales y fenotipo	116
4.1.1a Bioquímica plasmática	120
4.1.1b Metabolismo de la Glucosa	122
4.1.1c Funcionalidad cardíaca	127
4.1.2 Análisis del perfil de lípidos y esfingolípidos mediante Resonancia Magnética Nuclear o Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas.....	133
4.1.2a Evaluación de los niveles de lípidos en miocardio e hígado por Resonancia Magnética Nuclear	133
4.1.2b Evaluación de los niveles de lípidos en miocardio e hígado por nefelometría en ratones diabéticos	136
4.1.2c Evaluación de los niveles de ceramidas circulantes en plasma, en las fracciones de HDL y no-HDL, en miocardio e hígado mediante Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas	138
4.1.3 Evaluación de la captación de LDL "in vitro" e "in vivo"	150

4.1.3a	Análisis de esteatosis inducida en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2.....	150
4.1.3b	Evaluación de la captación de LDLnat y LDLox en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2.....	154
4.1.3c	Evaluación de la captación de LDLnat y LDLox en un modelo en ratones db/db	156
4.1.3d	Análisis de apoptosis inducida por LDLox en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2.....	159
4.1.4	Análisis de la expresión génica y niveles de proteínas en miocardio	161
4.2	Evaluación del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD en modelos animales de DM2	170
4.2.1	Parámetros corporales y fenotipo	170
4.2.1a	Bioquímica plasmática	175
4.2.2	Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la funcionalidad cardíaca	178
4.2.3	Efectos de FTY720/Fingolimod sobre dianas moleculares implicadas en la fisiopatología de la CMD	190
4.2.3a	Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación.....	190
4.2.3b	Efecto del FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis.....	201
4.2.3c	Efecto de FTY720/Fingolimod sobre otros mecanismos fisiopatológicos asociados a la CMD.....	206
5.	DISCUSIÓN.....	212
	Parte 1. Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD	212
	Elección del modelo animal de CMD	212
	Ceramidas y manifestación de CMD en ratones db/db.....	214
	Contribución de las lipoproteínas al remodelado miocárdico.....	220

Parte 2. Uso de un análogo estructural de la S1P (FTY720/Fingolimod) para el tratamiento de la CMD.....	222
FTY720/Fingolimod y disfunción diastólica	222
FTY720/Fingolimod: posibles mecanismos implicados.....	225
Estrés oxidativo	227
Disfunción mitocondrial	227
Inflamación	228
Estrés de retículo endoplasmático y apoptosis	229
6. CONCLUSIONES.....	231
Parte 1. Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD	231
Parte 2. Uso de un análogo estructural de la S1P (FTY720/Fingolimod) para el tratamiento de la CMD.....	232
7. REFERENCIAS.....	234

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diabetes: hallazgos globales en 2021.....	30
Figura 2. Mecanismos patogénicos de la CMD.....	34
Figura 3. Mecanismos moleculares de la CMD.....	35
Figura 4. Vía biosintética y metabolismo de los esfingolípidos.	58
Figura 5. Analogías estructurales entre FTY720/Fingolimod y S1P.....	74
Figura 6. Evaluación del desarrollo de CMD en un modelo de prediabetes (obesidad e insulinoresistencia)	82
Figura 7. Evaluación del desarrollo de CMD en un modelo de DM2.....	83
Figura 8. Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD en los fenotipos de DM2	84
Figura 9. Fórmula de Radding y Steinberg.....	89
Figura 10. Evaluación de la captación miocárdica de LDLox-Dil en un modelo animal de DM2.....	96
Figura 11. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa, en ratones no obesos y obesos	123
Figura 12. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia a la Insulina, en ratones no obesos y obesos.....	123
Figura 13. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa, en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	125
Figura 14. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia a la Insulina, en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat} .	126

Figura 15. Relación de los niveles de ceramidas en plasma, fracción de HDL; no-HDL y miocardio de ratones no obesos y obesos.....	141
Figura 16. Relación de los niveles de Cer 24:0 y Cer 24:1 en hígado y miocardio de ratones no obesos y obesos	142
Figura 17. Análisis de los niveles de esfingolípidos circulantes en plasma de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	143
Figura 18. Perfil de ceramidas circulantes en la fracción de HDL de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	144
Figura 19. Perfil de ceramidas circulantes en la fracción de no-HDL de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	145
Figura 20. Relación de los niveles de Cer 24:1 en la fracción HDL y miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	146
Figura 21. Relación de los niveles de ceramidas en la fracción de no-HDL y miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	147
Figura 22. Relación de los niveles de Cer 18:0 en hígado y plasma de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	149
Figura 23. Citotoxicidad celular en cardiomiocitos AC16 expuestos a condiciones miméticas de DM2.....	150
Figura 24. Micrografías representativas de cultivos de cardiomiocitos AC16 expuestas a diferentes condiciones miméticas de DM2.....	152
Figura 25. Micrografías representativas de cultivos de cardiomiocitos AC16 expuestos a condiciones miméticas de DM2 en presencia de LDLox ..	153
Figura 26. Cuantificación de lípidos celulares en cardiomiocitos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2 en ausencia/presencia de LDLox ..	154
Figura 27. Representación de la captación de LDLnat-Dil y LDLox-Dil marcadas con fluorocromo Dil por parte de los cardiomiocitos AC16 en condiciones miméticas de DM2.....	155

Figura 28. Representación gráfica de cinética de LDLox-Dil en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	157
Figura 29. Representación gráfica de cinética de LDLnat-Dil en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	158
Figura 30. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo en cardiomiocitos AC16 en presencia de LDLox en condiciones miméticas de DM2.....	160
Figura 31. Análisis Western blot de las proteínas CD36 y LRP-1 en miocardio de ratones no obesos y obesos	162
Figura 32. Análisis Western blot de marcadores de estrés de RE, autofagia y resistencia a la insulina en miocardio de ratones no obesos y obesos	164
Figura 33. Análisis Western blot de marcadores de estrés de RE, autofagia y resistencia a la insulina en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	168
Figura 34. Niveles de FTY720/Fingolimod y la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod en plasma y miocardio de ratones diabéticos db/db	172
Figura 35. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores del metabolismo esfingolípídico en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	181
Figura 36. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre S1PR1 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	182
Figura 37. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de daño miocárdico en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	183

Figura 38. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de marcadores del metabolismo esfingolípido en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	186
Figura 39. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre S1PR1 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	187
Figura 40. Análisis Western blot de la proteína S1PR1 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat} en presencia/ausencia de FTY720/Fingolimod	188
Figura 41. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de daño miocárdico en ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	189
Figura 42. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación sistémica en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	190
Figura 43. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	191
Figura 44. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db	193
Figura 45. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la proteína NF-kB p65 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	194
Figura 46. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación sistémica en ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat} ...	195
Figura 47. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	196

Figura 48. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	197
Figura 49. Relación entre el área positiva de IL-10 y TNF α medidas mediante inmunohistoquímica en miocardio y la relación de las ondas E/A (función diastólica) en ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	198
Figura 50. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la proteína NF-kB p65 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	199
Figura 51. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación en cardiomiocitos AC16 en presencia de PA de FTY720/Fingolimod fosforilado.....	200
Figura 52. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db...	202
Figura 53. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat} .	203
Figura 54. Relación entre el área positiva de caspasa 3 activada en miocardio y la relación de las ondas E/A (función diastólica) en ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	204
Figura 55. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo en cardiomiocitos AC16 en presencia de PA y de FTY720/Fingolimod fosforilado	205
Figura 56. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés de RE en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	206
Figura 57. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés de RE en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	207

Figura 58. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	208
Figura 59. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	209
Figura 60. Efecto de 3 meses de de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de función mitocondrial en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	210
Figura 61. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de función mitocondrial en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	210

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipo diabético en diferentes modelos animales de DM1 y DM2 frecuentemente utilizados para el estudio de cardiomiopatía diabética ..	38
Tabla 2. Características cardíacas de modelos animales seleccionados de DM2 en comparación con los pacientes.....	43
Tabla 3. Ceramidas cardíacas, apoptosis de cardiomiocitos y función cardíaca en modelos animales de cardiomiopatía lipotóxica, DM y obesidad	70
Tabla 4. Información nutricional de las dietas empleadas en el estudio de los modelos animales de prediabetes (obesidad inducida con dieta rica en grasas) y DM2	86
Tabla 5. Parámetros de funcionalidad cardíaca medidos en sístole y diástole mediante ecocardiografía transtorácica	98
Tabla 6. Condiciones de incubación de los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica de miocardio de los modelos animales de DM2...	102
Tabla 7. Listado de sondas TaqMan utilizadas para el análisis de expresión génica en miocardio de los modelos animales de DM2	105
Tabla 8. Listado de anticuerpos utilizados para el análisis de la abundancia relativa de proteínas mediante <i>Western blot</i> en miocardio de los modelos animales	107
Tabla 9. Medios de tratamientos empleados en el ensayo de citotoxicidad celular con cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2.....	110
Tabla 10. Parámetros corporales en ratones no obesos y obesos	116

Tabla 11. Parámetros corporales medidos en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	119
Tabla 12. Parámetros bioquímicos medidos en el plasma de los ratones no obesos y obesos.....	120
Tabla 13. Parámetros bioquímicos medidos en el plasma de los ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	121
Tabla 14. Parámetros bioquímicos de la homeostasis de la glucosa, medidos en el plasma de los ratones no obesos y obesos.....	122
Tabla 15. Parámetros bioquímicos de la homeostasis de la glucosa, medidos en el plasma de los ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	125
Tabla 16. Análisis de la función diastólica medidos en ratones no obesos y obesos.....	127
Tabla 17. Análisis de la función sistólica medidos en ratones no obesos y obesos.....	128
Tabla 18. Análisis de la función diastólica medidos en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	130
Tabla 19. Análisis de la función sistólica en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	131
Tabla 20. Análisis del perfil de lípidos en miocardio de ratones no obesos y obesos.....	133
Tabla 21. Análisis del perfil de lípidos en hígado de ratones no obesos y obesos.....	134
Tabla 22. Análisis del perfil de lípidos en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	134
Tabla 23. Análisis del perfil de lípidos en hígado de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	135

Tabla 24. Lípidos medidos mediante nefelometría en hígado y miocardio de los ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	136
Tabla 25. Análisis de los niveles de esfingolípidos circulantes en plasma de ratones no obesos y obesos.....	138
Tabla 26. Análisis de los niveles de ceramidas circulantes en la fracción HDL de ratones no obesos y obesos	139
Tabla 27. Análisis de los niveles de ceramidas circulantes en la fracción no-HDL de ratones no obesos y obesos	139
Tabla 28. Análisis de los niveles de esfingolípidos en miocardio de ratones no obesos y obesos.....	140
Tabla 29. Análisis de los niveles de ceramidas en hígado de ratones no obesos y obesos.....	142
Tabla 30. Análisis de esfingolípidos en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	146
Tabla 31. Análisis de esfingolípidos en hígado de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	148
Tabla 32. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de receptores lipídicos y marcadores de daño en miocardio de ratones no obesos y obesos.....	161
Tabla 33. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de marcadores de inflamación y estrés de RE en miocardio de ratones no obesos y obesos.....	163
Tabla 34. Perfil de marcadores proteicos de estrés de RE, autofagia y resistencia a la insulina analizados por Western blot en miocardio de ratones no obesos y obesos.....	164

Tabla 35. Análisis de la expresión génica de receptores lipídicos y marcadores de daño en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	165
Tabla 36. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de marcadores de inflamación y estrés de RE en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	166
Tabla 37. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de marcadores de estrés oxidativo y función mitocondrial en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	167
Tabla 38. Perfil de marcadores proteicos de estrés de RE, autofagia, resistencia a la insulina y receptores de lipoproteínas analizados por Western blot en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db _{cat}	169
Tabla 39. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros corporales de ratones db/+ y diabéticos db/db.....	170
Tabla 40. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros corporales de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	174
Tabla 41. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros bioquímicos plasmáticos de ratones db/+ y diabéticos db/db	175
Tabla 42. Efecto de la administración de FTY720 sobre los parámetros bioquímicos plasmáticos de ratones db/+ y diabéticos db/db _{cat}	177
Tabla 43. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros de la función diastólica en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	178
Tabla 44. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros de la función sistólica en ratones db/+ y diabéticos db/db.....	179

Tabla 45. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/ Fingolimod sobre los parámetros de la función diastólica en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}..... 184

Tabla 46. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros de la función sistólica en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}..... 185

ABREVIATURAS

ACS	Acil-CoA sintetasa 1 de cadena larga
AGE	Productos finales de glicación avanzada
AGL	Ácidos grasos libres
ALT	Alanina aminotransferasa
ApoB	Apolipoproteína B
ApoM	Apolipoproteína M
AST	Aspartato aminotransferasa
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1
BSA	Albúmina sérica bovina
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
CCK-1R	Receptor de colecistoquinina-1
CerS	Ceramida sintasas
CMD	Cardiomiopatía diabética
Co-A	Coenzima A
db/db	Ratones deficientes en el receptor de la leptina
db/db cat	db/db catabólicos
dhCer	Dihidroceramidas
DHEA	Antioxidante dehidroepiandrosterona
Dil	1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
FAT/CD36	Translocasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FGF21	Factor de crecimiento fibroblástico 21
FT	Factor de transcripción
GK	Ratas Goto-Kakizaki
GLO1	Enzima glioxalasa-1
GLUT4	Transportador de glucosa 4

GPX	Glutación peroxidasa
HBP	Vía biosintética de hexosamina
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFpEF	<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>
HFREF	<i>Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i>
HNE	4-hidroxinonenal
IC	Insuficiencia cardíaca
IR	Receptor de insulina
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLnat	LDL nativa
LDLnat-Dil	LDL nativa marcada con Dil
LDLox	LDL oxidada
LDLox	LDL oxidadas
LDLox-Dil	LDL oxidada marcada con Dil
MFF	Factor de fisión mitocondrial
MHC-PPAR α	<i>Myosin Heavy Chain-Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 β
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio
OA	Ácido oleico
ob/ob	Ratones deficientes en leptina
OLETF	Ratas obesas Otsuka Long-Evans Tokushima
ORO	<i>Oil red O</i>
PA	Ácido palmítico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK4	Piruvato deshidrogenasa quinasa 4
PPAR α	Receptor activado por proliferador de peroxisomas α
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
PTI	Prueba de tolerancia a la insulina
PW	<i>Power Doppler</i>

RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RAGE	Receptor de AGE
RAP	Receptor-Associated Protein
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1P	Esfingosina 1-fosfato
S1PR	Receptores de S1P
SMasa	Esfingomielinasa
Sph	<i>Sphingosine</i>
SphK	Esfingosina quinasas
SPT	Serina palmitoil-transferasa
SREBP-1c	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides-1c
SSO	Sulfo-N-Succinimidil Oleato
STZ	Streptozotocina
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TGRL	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
UCP	Proteínas de desacoplamiento
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato-N-acetilglucosamina
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
ZDF	Ratas diabéticas Zucker
ZF	Ratas obesas Zucker

RESUMEN

La cardiomiopatía diabética (CMD) es una de las principales complicaciones de la diabetes. Actualmente no se disponen de biomarcadores específicos para su diagnóstico/pronóstico ni de un tratamiento dirigido.

Objetivos

En este trabajo se analizó la relación entre el perfil circulante de ceramidas y las alteraciones metabólicas y cardíacas de la CMD en modelos experimentales de obesidad e insulinoresistencia (ratones db/+ alimentados con una dieta rica en grasas) y de diabetes mellitus tipo 2 DM2 (ratones db/db). También se estudió el metabolismo de LDL oxidadas (LDLox) en ratones db/db y su contribución en la acumulación de lípidos y la apoptosis en cardiomiocitos humanos (AC16) en condiciones de DM2. Por otro lado, se evaluó el efecto del tratamiento con FTY720/Fingolimod sobre signos de CMD en ratones db/db.

Resultados

Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD

Los ratones obesos no presentaron signos de CMD tras 5 meses en una dieta rica en grasas. En este modelo los niveles plasmáticos de Cer 18:0 se encontraron aumentados y directamente correlacionaron con los medidos en miocardio. Por otro lado, durante el seguimiento de ratones db/db (4 meses) un subgrupo desarrolló un fenotipo de DM2 más avanzado (ratones db/db_{cat}). Tanto en ratones db/db y db/db_{cat}, se detectaron signos de disfunción diastólica acompañada de las fracciones de eyección/acortamiento preservadas. El contenido de ceramidas miocárdicas en ratones db/db no difirió del de los no diabéticos, mientras que se encontraron disminuidas en miocardio de ratones db/db_{cat}. Ambos

modelos animales exhibieron niveles plasmáticos de Cer 18:0 incrementados y directamente relacionados con sus niveles hepáticos. En cuanto a las LDLox, su captación se vio aumentada en miocardios de ratones db/db; posiblemente mediada a través de receptores CD36 y LDLR/LRP1 tal y como se observó en cultivos de cardiomiocitos AC16. La presencia de estas LDLox indujo apoptosis tardía y muerte celular *in vitro*.

Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD

La administración oral de FTY720/Fingolimod protegió contra el desarrollo de CMD en ambos grupos de ratones db/db. Esto se acompañó de una mejora en la inflamación sistémica. Sin embargo, y a diferencia de los ratones db/db_{cat}, la disfunción cardíaca en ratones db/db se acompañó de cambios en la expresión génica de marcadores involucrados en la dinámica mitocondrial miocárdica, mientras que los miocardios de ratones db/db_{cat} exhibieron unos niveles de inflamación, estrés de retículo endoplasmático (RE) y apoptosis aumentados. FTY720/Fingolimod previno del desarrollo de la CMD *in vivo* tras 3 meses de tratamiento en ambos grupos de ratones db/db. En el modelo db/db esta mejora se relacionó con una disminución de la expresión génica de marcadores involucrados en la dinámica mitocondrial, mientras que en ratones db/db_{cat} se relacionó con una disminución en la abundancia relativa de TNF α en miocardio y de Nf- κ B p65 en núcleos celulares, así como de la forma activa de la caspasa 3. Además, se observó una reducción significativa en la expresión génica de marcadores de estrés de RE en miocardios de ratones tratados. Los efectos antiinflamatorio y anti-apoptótico de FTY720/Fingolimod se confirmaron en cardiomiocitos humanos AC16.

Conclusiones

Los ratones db/db y db/db_{cat} presentaron signos de CMD. Este fenotipo se acompañó de unos niveles aumentados de Cer 18:0 circulantes. A diferencia de los ratones db/db_{cat}, la disfunción miocárdica en el modelo db/db no se acompañó de cambios en inflamación, estrés de RE y apoptosis, sino con signos de una dinámica mitocondrial alterada. La administración de FTY720/Fingolimod protegió contra el desarrollo de CMD. En ambos grupos de ratones db/db el tratamiento mostró un efecto antiinflamatorio sistémico, pero solo en ratones db/db_{cat}, esta mejora cardíaca se relacionó con un efecto antiinflamatorio y anti-apoptótico en miocardios de ratones tratados.

1. INTRODUCCIÓN

Incidencia y prevalencia de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una condición metabólica crónica caracterizada por la presencia de unos niveles elevados de glucosa en la sangre, hay dos tipos principales de diabetes. La DM más común es la diabetes tipo 2 (DM2). Esta condición se da generalmente en sujetos adultos y representa al menos el 90% de todos los casos de diabetes ^{1,2}. La DM2 ocurre cuando el organismo se vuelve resistente a la acción de la insulina y/o no produce suficiente insulina para garantizar un metabolismo adecuado de la glucosa. Esta afección es progresiva y puede pasar desapercibida durante muchos años ². Requiere control del estilo de vida (dieta y ejercicio) en todas las etapas. Con el tiempo, la mayoría de las personas con DM2 necesitarán medicamentos antidiabéticos orales o insulina.

Además de la DM2, la DM tipo 1 (DM1), es una patología autoinmune crónica que afecta alrededor del 10% de las personas con DM diagnosticada y en la que se produce un daño de las células beta pancreáticas y son incapaces de producir suficiente insulina que garantice un manejo adecuado de la glucosa.

Según datos de 2021 (Figura 1), se estima que en la actualidad hay alrededor de 537 millones de personas con DM en el mundo (en el rango de edades comprendido entre 20-79 años) ². Se atribuyen a la DM alrededor de 6,5 millones de muertes anuales. A nivel poblacional, un dato muy relevante es que de la mayoría de las personas con DM, tres cuartas partes, vive en países de ingresos bajos y medios ². Esto último es importante desde un punto de vista socioeconómico, ya que relaciona directamente el nivel de ingresos con el valor nutricional de los productos adquiridos para la alimentación. O lo que es lo mismo, las personas con

bajos ingresos económicos tienden en general a comprar productos con un coste más accesible.



Figura 1. Diabetes: hallazgos globales en 2021.

La 10ª edición del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de diabetes informa de un aumento global continuo en la prevalencia de la diabetes. Fuente: 10.ª edición del Atlas de la diabetes de la FID y otros recursos ².

Dado que la DM2 es una enfermedad incapacitante, directa o indirectamente a través de sus complicaciones, no sólo supone un lastre considerable a las personas afectadas, sino también a las familias y al sistema de salud de los estados. En este caso, se calcula que los gastos totales en sanidad, directos e indirectos, atribuibles a la diabetes en el mundo el año pasado (2021) ascendieron a ~\$966 mil millones ².

Según consta en este reporte ², las cifras de la DM en Europa son igualmente elevadas. En este continente 1 de cada 11 adultos (61 millones) tuvo DM en 2021, alcanzándose la cifra de 1,1 millones de muertes por DM. Las previsiones son que el número de adultos con DM alcance los 67 millones para 2030 y los 69 millones para 2045. Otros datos relevantes de esta fuente indican que actualmente continúan sin

diagnosticarse más de 1 de cada 3 (36%) adultos que padecen DM. Por otro lado, los costes directos e indirectos de la DM fueron de aproximadamente \$189 mil millones en 2021, representando casi una quinta parte de los fondos dedicados a escala mundial.

Obesidad y diabetes mellitus

En las últimas tres décadas, la prevalencia de la DM2 ha aumentado, junto con la de la obesidad, alcanzándose cifras pandémicas ^{3,4}. Esto último es en parte debido a la adopción de unas pautas de estilo de vida cada vez más sedentario y al consumo excesivo de alimentos con un valor nutricional deficiente, como los productos procesados e hipercalóricos ⁵. Consistentemente, diferentes estudios epidemiológicos sugieren que tanto la DM2 como la obesidad se encuentran estrechamente relacionadas entre sí ⁶. De hecho, se considera a la obesidad (y el sobrepeso) como uno de los factores de riesgo más importantes de la DM2, con casi el 80-90% de los pacientes con DM2 manifestando esta condición ^{6,7}. Ambas patologías tienen además un impacto multisistémico, y están asociadas con una mayor mortalidad y riesgo cardiovascular ⁸, compartiendo diferentes componentes de síndrome metabólico ⁹.

En este contexto, y teniendo en cuenta que la obesidad es una condición en gran medida prevenible, la investigación de diferentes estrategias anti-obesidad (farmacológicas y dietéticas) dirigidas a prevenir su desarrollo o reducirla es un campo de intensa actividad científica. Sin embargo, y hasta la fecha, los efectos de las diferentes estrategias solo han resultado ser moderados y en cualquier caso no sostenidos en el tiempo ¹⁰. No cabe duda de que se requiere de una mejor comprensión de la etiología de la obesidad, para conseguir desarrollar estrategias de prevención y tratamiento más exitosas y personalizadas.

Las complicaciones cardíacas suelen estar frecuentemente relacionadas con el desarrollo de DM

La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de muerte y discapacidad entre los pacientes con DM ⁸. La DM exacerba los mecanismos que conducen al desarrollo de arterosclerosis e insuficiencia cardíaca (IC). Desafortunadamente, no existen estrategias terapéuticas específicas más allá de proceder con la optimización del control glucémico con fármacos antidiabéticos o enfoques de adaptación dietética y ejercicio físico moderado.

El contexto de la reducción multifactorial del riesgo cardiovascular se da en la actualidad con estatinas y otros agentes hipolipemiantes, terapias antihipertensivas y estrategias de tratamiento hipoglucemiante, reduciéndose de este modo las tasas de mortalidad relacionadas con las complicaciones cardiovasculares que desarrollan los pacientes con un riesgo elevado. A pesar de ello, la mortalidad por causas cardiovasculares sigue siendo más altas en los sujetos con DM en comparación con los no diabéticos.

La incidencia de disfunción miocárdica e IC son una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en sujetos con DM ^{11, 12}. De hecho, el riesgo de IC aumenta tanto en sujetos con DM2 ¹³ como en DM1 ¹⁴., Consistentemente, la DM es muy prevalente entre los pacientes con IC ^{14, 15}, especialmente aquellos con IC y fracción de eyección preservada ¹⁶.

A partir de estudios poblacionales se deduce que el riesgo de IC en sujetos con DM (particularmente la DM2) aumenta significativamente después de ajustar por factores de riesgo de IC bien establecidos ¹⁷ y que el 19% de los pacientes con IC tienen DM2 ¹⁸. La forma específica resultante de cardiomiopatía se conoce como "cardiomiopatía diabética" (CMD) ¹⁹. Aunque el concepto de CMD a menudo se considera que sólo se refiere a

personas afectadas por DM2, al ser esta una cardiomiopatía inducida metabólicamente, independiente de la hipertensión, nefropatía o cardiomiopatía isquémica (de origen vascular) también se ha reportado en personas con DM1 ^{20, 21} y en pacientes con obesidad ²²⁻²⁵.

Patogénesis de la CMD

Se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos que influyen directamente en el remodelado y disfunción cardíaca característicos de la CMD y probablemente son multifactoriales ^{17, 26} (Figura 2). Lo cierto es que no se conocen con exactitud. Entre los factores sistémicos que frecuentemente se relacionan con esta forma de cardiomiopatía se incluyen alteraciones metabólicas, relacionadas principalmente con una señalización deficiente de la insulina, como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, y el aumento de los niveles de ácidos grasos libres y triglicéridos circulantes ²⁷⁻³⁰. La inflamación sistémica también parece tener un papel en la etiopatogenia de la IC ^{31, 32}. Es interesante destacar que la mayoría de las alteraciones mencionadas forman también parte del denominado síndrome metabólico, que acumula diferentes factores de riesgo cardiovascular ⁹.

En el estudio de las bases metabólicas del remodelado y disfunción miocárdica relacionados con la CMD también se ha reportado la contribución de otras alteraciones en la función mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico (RE), autofagia y homeostasis del calcio miocárdico, aunque posiblemente sean consecuencia de una señalización deficiente a la insulina. También se han descrito otros mecanismos fisiopatológicos que potencialmente podrían contribuir en el desarrollo de la CMD, incluyendo alteraciones microvasculares, y de diferentes sistemas como el nervioso simpático, y renina-angiotensina-aldosterona, ^{26, 33}.

En el contexto de la DM, podría hipotetizarse que todas estas alteraciones podrían contribuir en el remodelado y disfunción cardíacas en modelos experimentales y en pacientes²⁶.

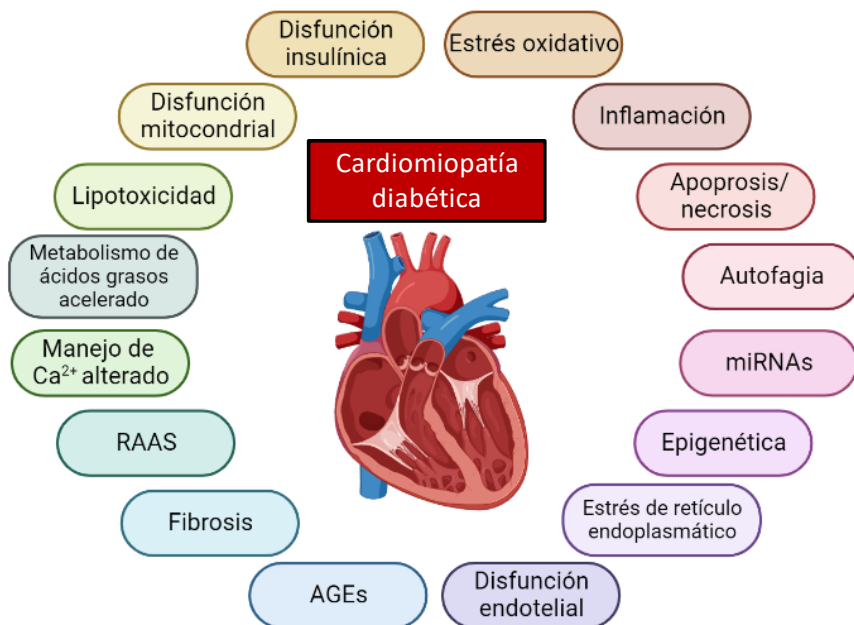


Figura 2. Mecanismos patogénicos de la CMD.

Figura adaptada a partir de la publicada previamente ¹⁷.

La lipotoxicidad y la acumulación de lípidos cardíacos son otros factores que se han relacionado con la etiopatogenia de la CMD ³⁴ (ver también sección **Mecanismos de CMD**) (Figura 3). Los estudios de metabolismo miocárdico han mostrado una captación miocárdica de glucosa reducida combinada con una captación aumentada de ácidos grasos en sujetos con DM1 ³⁵. En este contexto, la deficiencia de insulina promueve la movilización de ácidos grasos de los depósitos de grasa, lo que da como resultado un exceso de biodisponibilidad de ácidos grasos en diferentes tejidos no adiposos. Cuando se excede la capacidad de almacenamiento y oxidación de los ácidos grasos movilizados en estos tejidos periféricos, la maquinaria enzimática celular también habilita su transformación en

otras especies reactivas (como las ceramidas) contribuyendo aún más a la lipotoxicidad en muchos tejidos diana, incluyendo el miocardio. Esta causa de cardiopatía no isquémica y no hipertensiva a menudo se denomina cardiopatía diabética o “lipotóxica”.

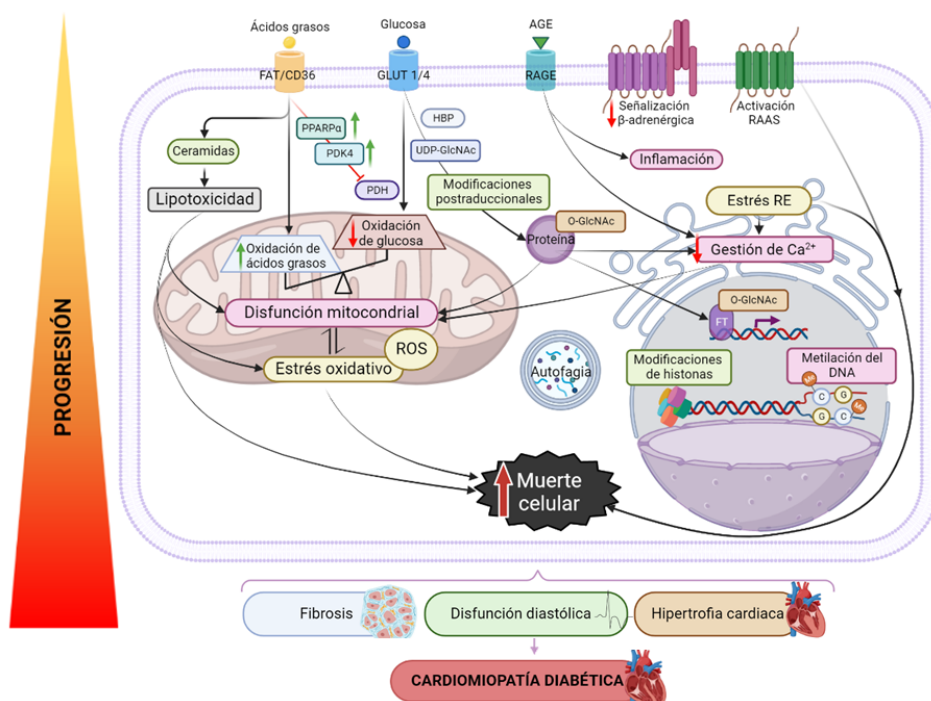


Figura 3. Mecanismos moleculares de la CMD.

↑ aumentado/↓ disminuido en relación con las condiciones no patológicas. Abreviaturas: AGE, productos finales de glicación avanzada; AT1R, receptor de angiotensina II tipo 1; RE, retículo endoplásmico; FAT/CD36, translocasa de ácidos grasos; HBP, vía biosintética de hexosamina; IR, receptor de insulina; PDH, piruvato deshidrogenasa; PDK4, piruvato deshidrogenasa quinasa 4; PPAR α , receptor activado por proliferador de peroxisomas α ; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterona; RAGE, receptor de AGE; ROS, especies reactivas de oxígeno; FT, factor de transcripción; UDP-GlcNAc, uridina difosfato-N-acetilglucosamina. Figura adaptada a partir de la publicada previamente ³³.

La dislipidemia diabética también puede contribuir a la disfunción miocárdica en los diabéticos. En particular, el exceso de flujo de ácidos grasos movilizados hacia el hígado promueve la sobreproducción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TGRL) y sus remanentes. En la práctica clínica habitual las elevaciones en las concentraciones circulantes de

TGRL circulantes suelen fácilmente identificarse a través de la detección de concentraciones elevadas de la fracción de colesterol remanente (definido como la diferencia entre la concentración sérica de colesterol total, de LDL y HDL). Los niveles circulantes de colesterol remanente suelen presentarse además con concentraciones disminuidas de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que a su vez se relaciona con el desarrollo de cardiomiopatía de origen isquémico, i.e., macrovascular ³⁶. Sin embargo, su contribución al desarrollo de cardiomiopatía no isquémica sigue poco explorada.

Modelos animales de cardiomiopatía diabética

A escala humana el desarrollo de obesidad y DM implica décadas de cambios fisiopatológicos en diferentes tejidos diana, incluyendo el miocárdico. Por esta y otras razones, incluyendo las éticas, el estudio a largo plazo de los mecanismos de acción y de las complicaciones relacionadas con estas condiciones es un objetivo difícil de alcanzar en seres humanos.

Existen varios modelos experimentales para el abordaje de los efectos de la DM y obesidad en tejidos diana y de este modo eludir algunas de las limitaciones de los modelos humanos. En el contexto de las enfermedades cardíacas, se han generado numerosos modelos animales, potencialmente útiles para estudiar el impacto de la DM1 y DM2 sobre el miocardio. En esta sección trataremos de revisar los principales modelos animales existentes para el estudio de la CMD.

Los roedores, especialmente ratones y ratas, son las dos especies más utilizadas para la investigación de los mecanismos involucrados en el desarrollo de CMD ³³. Los genomas humano, de ratón y de rata tienen casi el mismo tamaño, cada uno contiene alrededor de 30.000 genes codificantes, con alrededor del 99% de los genes codificantes en el

genoma del ratón tienen un homólogo en humanos ^{37, 38}. La disponibilidad tanto de cepas genéticamente definidas, como de técnicas de manipulación genética han permitido evaluar la contribución de algunas dianas moleculares en el desarrollo de la CMD.

Además de las similitudes genómicas antes indicadas, otras ventajas de los modelos de roedores son su ciclo de reproducción corto y la disponibilidad de una variedad de modelos diseñados genéticamente, i.e., pérdida o ganancia de función de genes diana, disponibilidad de modelos monogénicos y poligénicos, y diferentes modelos de exposición ambiental (incluyendo tratamientos dietéticos y farmacológicos).

Las principales características de los modelos de roedores de DM1 y DM2 más comúnmente utilizados para estudiar los mecanismos fisiopatogénicos de la CMD se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Fenotipo diabético en diferentes modelos animales de DM1 y DM2 frecuentemente utilizados para el estudio de cardiomiopatía diabética

Modelo	Especie	Intervención	Manipulación y diana	Debut de DM y Fenotipo
DM1				
STZ	<i>Mus musculus</i>	Farmacológica	Inyección Célula β	2 días Necrosis y producción deficiente de insulina, hiperlipidemia
Aloxano	<i>Mus musculus</i>	Farmacológica	Inyección Célula β	5 días Necrosis y producción deficiente de insulina, triglicéridos elevados
OVE26	<i>Mus musculus</i>	Transgénico	Sobreexpresión Calmodulina	2-3 semanas Daño en células β y triglicéridos elevados
NOD	<i>Mus musculus</i>	Genético	Insulinitis Célula β	30 semanas Daño en células β y triglicéridos elevados
Akita	<i>Mus musculus</i>	Genético	Mutación espontánea no codificante Gen <i>Ins2</i>	5-6 semanas Produce un plegamiento inadecuado de la insulina, facilita el estrés de retículo endoplasmático, daño en células β y triglicéridos elevados
DM2				
Dieta rica en grasas y sacarosa	<i>Mus musculus</i>	Inducido por dieta	Alimentación	1 semana Obesidad y triglicéridos elevados
Dieta rica en grasas y STZ	<i>Mus musculus</i>	Dieta y farmacológico	Alimentación + inyección	2-10 semanas

			Célula β	Obesidad y resistencia a la insulina
ob/ob	<i>Mus musculus</i>	Genético	Deficiencia Leptina	8-15 semanas Obesidad y resistencia a la insulina, triglicéridos y ácidos grasos elevados
db/db	<i>Mus musculus</i>	Genético	No funcional Receptor de la leptina	4-8 semanas Obesidad y resistencia a la insulina; glucosa, triglicéridos y ácidos grasos elevados
ZF/ZDF	<i>Rattus norvegicus</i>	Genético	No funcional Receptor de la leptina	14 semanas Obesidad y resistencia a la insulina; glucosa, triglicéridos y ácidos grasos elevados
Goto-Kakizaki (GK)	<i>Rattus norvegicus</i>	Transgénico	Sobreexpresión SREBP-1c	3 semanas Resistencia a la insulina, triglicéridos y ácidos grasos elevados
OLETF	<i>Rattus norvegicus</i>	Poligénico	Defecto en el control de ingesta CCK-1R, Odb2	18 semanas Obesidad, triglicéridos elevados
KK-Ay	<i>Mus musculus</i>	Poligénico	Espontáneo gen Agouti yellow obese (<i>A^y/a</i>)	8-16 semanas Obesidad y resistencia a la insulina, triglicéridos elevados
NZO/HiLt (machos)	<i>Mus musculus</i>	Poligénico	Espontáneo Anticuerpos contra el transportador de la leptina	12-24 semanas Obesidad y resistencia a la insulina, resistencia a la leptina
TallyHo/JngJ (machos)	<i>Mus musculus</i>	Poligénico	Espontáneo Tanidd1-3	10-16 semanas Obesidad, hiperlipidemia, hiperinsulinemia

NONcNZO10/LtJ	<i>Mus musculus</i>	Poligénico	Espontáneo Homeostasis del metabolismo del Zinc y de la glucosa	8-24 semanas Obesidad y resistencia a la insulina
---------------	---------------------	------------	--------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------

Abreviaturas: DM, diabetes mellitus; STZ, ratones inducidos con estreptozotocina; ratones diabéticos OVE26, OVE26; NOD, ratones diabéticos no obesos; Akita, ratón C57BL/6NSlc con una mutación espontánea en el gen *Insulin -2*; ob/ob, ratones deficientes en leptina; db/db, ratones deficientes en el receptor de la leptina; ZF, ratas obesas Zucker; ZDF, ratas diabéticas Zucker; GK, ratas Goto-Kakizaki; CCK-1R, receptor de colecistoquinina-1; Odb2, gen diabetogénico localizado en el cromosoma 14; SREBP-1c, proteína de unión a elementos reguladores de esteroides-1c; OLETF, ratas obesas Otsuka Long-Evans Tokushima; KK-Ay, ratones Kuo Kondo transgénicos del gen Agouti yellow obese (*A^{y/a}*); NZO, ratones obesos de Nueva Zelanda; Tanidd1, loci de rasgo cuantitativo del cromosoma 19 de ratón asociado con DM en ratones TALLYHO; NONcNZO10/LtJ, cepa congénica recombinante que comprende aproximadamente el 88% de la contribución del genoma de la cepa NON/LtJ (no obesa y no diabética) y el 12% de la cepa obesa de Nueva Zelanda. Tabla adaptada a partir de la publicada previamente ^{39, 40}.

Dado que este trabajo se centró en el estudio del efecto de la DM2 sobre el desarrollo de CMD, en esta sección solo se abordaron aquellos modelos animales de CMD en un contexto de diabetes. Los modelos transgénicos de obesidad, resistencia a la insulina y DM2 comúnmente utilizados son los ratones *ob/ob*⁴¹ y *db/db*⁴², que se basan en la deficiencia o la resistencia a la leptina, respectivamente. Del mismo modo, las ratas *Zucker Fat* (ZF) desarrollan obesidad como consecuencia de los receptores de leptina no funcionales⁴³. Las ratas diabéticas *Zucker* (ZDF) se generaron cruzando entre sí ratas ZF con concentraciones séricas elevadas de glucosa⁴⁴. Por otro lado, las ratas *Goto-Kakizaki* (GK) son una cepa endogámica, derivada de ratas Wistar, que desarrollan espontáneamente DM2⁴⁵.

Además de estos modelos más directos de DM, se han generado otros modelos transgénicos que replican ciertas características de la CMD. Por ejemplo, los ratones con sobreexpresión específica en cardiomiocitos del MHC-PPAR α (del inglés, *Myosin Heavy Chain-Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) muestran un aumento de la oxidación de ácidos grasos cardíacos y un fenotipo similar a la CMD. La investigación de estos modelos ayuda a explorar los mecanismos por los cuales la oxidación alterada del sustrato cardíaco afecta la función contráctil, en ausencia de alteraciones metabólicas sistémicas asociadas con la DM⁴⁶⁻⁴⁸. Los ratones deficientes para el receptor de insulina selectivo de cardiomiocitos (CIRKO) se utilizan para estudiar el efecto de la disminución de la señalización de insulina en los cardiomiocitos sin causar alteraciones metabólicas a nivel sistémico⁴⁹.

En la Tabla 2 se muestran las principales características morfológicas y metabólicas en miocardio de diferentes modelos experimentales frecuentemente utilizados para el estudio de la CMD y se comparan con los hallazgos en pacientes con DM1 y DM2. A pesar de las limitaciones

específicas de los diferentes modelos generados, estos imitan varias de las características estructurales y funcionales observadas en el miocardio diabético por lo que aún hoy día continúan siendo modelos útiles para explorar con mayor profundidad el/los mecanismo/s de la patología subyacente a la CMD.

Tabla 2. Características cardíacas de modelos animales seleccionados de DM2 en comparación con los pacientes

	Pacientes	DM2					
		Inducido con dieta +/- STZ		Modelos animales Genético			
		HFD/HSD	HFD + low dose STZ	ob/ob	db/db	ZF/ZDF	GK
Metabolismo de sustratos							
Oxidación de ácidos grasos	↑	↑		↑	↑	↑	
Oxidación de la glucosa	=/↓	↓		↓	↓	↓	
Eficiencia cardíaca	↓	=		↓	↓	=	
Función mitocondrial	↓	=		↓	↓		
Contenido mitocondrial	=			↑	↑		
Mecanismos celulares							
Dinámica del Ca ²⁺	↓			↓	↓		↓
Estrés oxidativo	↑	↑	↑	↑	↑	=/↑	↑
Inflamación		↑				↑	
Triglicéridos/lipotoxicidad	↑	=/↑		↑	↑	↑	
Activación de RAAS	↑						
AGE	↑	↑			↑	↑	
ER stress		↑					
Autofagia	=/↓	↓/=/↑					
Muerte celular	↑			↑	↑	↑	
Fibrosis	↑	↑		=		↑	
Morfología y función cardíacas							
Tamaño cardíaco	↑	=/↑	↑	=/↑	=	↑	↑
Función contráctil	↓	=/↓	↓	↓/=/↑	=/↓	↓	↓

↑ aumentado; ↓ disminuido; = no se observa diferencia. Abreviaturas: AGE, productos finales de glicación avanzada; CIRKO, ratones con delección del receptor de insulina selectiva de cardiomiocitos; RE, retículo endoplásmico; GK, ratas Goto-Kakizaki; HFD/HSD, dieta alta en grasas/alta en sacarosa; MHC-PPAR α , ratones con sobreexpresión específica de cardiomiocitos del receptor activado por proliferador de peroxisomas α (PPAR α); NOD, ratones diabéticos no obesos; ratones diabéticos OVE26, OVE26; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; STZ, estreptozotocina; ZDF, ratas grasas diabéticas Zucker; ZF, ratas grasas Zucker. Tabla adaptada a partir de la publicada previamente ³³.

Mecanismos de cardiomiopatía diabética

Se han descrito diferentes mecanismos potencialmente involucrados en el desarrollo de CMD (Figura 3, Tabla 2)³³. Sin embargo, en este trabajo sólo se estudió la contribución de algunos de ellos. En los siguientes subapartados se describen aquellos considerados más relevantes para este trabajo.

1. Alteraciones en el metabolismo de sustratos energéticos

Como ya se ha avanzado previamente, el impacto de la DM en el miocardio se caracteriza por un aumento de la oxidación de ácidos grasos y una disminución concomitante en la oxidación de la glucosa (Figura 3). El cambio a favor de la metabolización de ácidos grasos en detrimento de la glucosa en miocardio es una de las características principales de esta cardiomiopatía en pacientes y modelos experimentales de DM⁵⁰⁻⁵³.

Desde un punto de vista mecanístico, este cambio podría deberse a una disminución en la captación y metabolización de glucosa en tejido cardíaco combinada con una disminución concomitante en la abundancia del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en sujetos con obesidad y resistencia a la insulina^{50, 54}. Por otro lado, el aumento de la captación de ácidos grasos por parte de los miocardios diabéticos podría ser debido a un aumento de su transporte mediado por FAT/CD36 en la membrana plasmática de los cardiomiocitos⁵⁵.

En condiciones de DM, el aumento de las concentraciones circulantes de ácidos grasos libres induce la actividad del factor de transcripción PPAR α ⁵⁶, y de este modo la expresión de genes implicados en su captación, transporte y oxidación⁵⁷. En este sentido y entre otras acciones, PPAR α aumenta la expresión de PDK4, y con ello disminuye la actividad de PDH⁵⁸, lo que suprimiría aún más la oxidación de la glucosa en favor de la de ácidos grasos^{50, 59}. Consistentemente, los miocardios de ratones que

sobreexpresan PPAR α (ratones MHC-PPAR α) se caracterizan por presentar un aumento en la capacidad oxidativa de ácidos grasos y un fenotipo metabólico similar al encontrado en CMD ^{47, 60}. A su vez, la activación dual del PPAR α /PPAR γ inhibe además el eje SIRT1-PGC1 α , contribuyendo aún más a la disfunción cardíaca en ratones tratados con agonistas de estos PPAR ⁶¹, y sugiriendo además un posible nuevo mecanismo de acción por parte de cantidades elevadas de ácidos grasos en el miocardio.

La producción de ATP a partir de los ácidos grasos es menos eficiente que la resultante a partir de la utilización de glucosa como sustrato. La oxidación de ácidos grasos en el miocardio diabético se encuentra relacionada con un consumo de oxígeno más elevado; sin que ello resulte en un aumento proporcional de la función contráctil, lo que resulta en una mayor ineficiencia cardíaca (trabajo cardíaco/moléculas de oxígeno consumidas) en comparación con la que mostraría el mismo tejido en una condición no diabética o utilizando la glucosa como sustrato energético.

Los ratones ob/ob y db/db son uno de los modelos elegidos para estudiar los efectos sobre el miocardio por parte del desacoplamiento mitocondrial combinado con una acumulación aumentada de ROS, debida a la oxidación de ácidos grasos por parte de ese tejido ^{62, 63} (Tabla 2). Aunque las ROS tienen una vida media muy corta, estas especies son especialmente reactivas, por lo que se considera que causan daño celular muy cerca de su sitio de origen, sugiriéndose que las mitocondrias, su principal lugar de producción, podrían ser su diana celular principal ^{64, 65}. A su vez, la acumulación de ROS también se ha reportado que activa la función de las proteínas de desacoplamiento (UCP) ^{66, 67}, resultando esto último en una disminución neta en la producción de ATP (desacoplamiento mitocondrial). No cabe duda de que a largo plazo esto último conduce a una disminución de la eficiencia cardíaca, en la medida en que continúa la

oxidación de cantidades elevadas de ácidos grasos en ese tejido. Los cambios en el desacoplamiento mitocondrial mediado por ácidos grasos y el aumento de los niveles de ROS miocárdicos, así como la disminución de la eficiencia cardíaca están presentes en ratones ob/ob y db/db con DM2 ^{63, 68}.

2. *Disfunción mitocondrial*

La disfunción mitocondrial es otra de las características de la CMD (Tabla 2). En diferentes estudios experimentales, se ha relacionado una capacidad oxidativa mitocondrial disminuida ^{50, 62, 63, 69-79} con remodelado de las mitocondrias ^{63, 70, 78-80}, cambios en el contenido de proteínas mitocondriales ^{73, 79, 81, 82} y daño oxidativo de proteínas y DNA mitocondriales ⁸³.

3. *Estrés oxidativo*

El estrés oxidativo se manifiesta a través de una acumulación de los niveles de ROS, que es causado por el aumento de la generación mitocondrial de ROS o por la disminución de la eficiencia de los captadores de ROS, es decir, la glutatión peroxidasa (GPX), la catalasa y la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD).

El estrés oxidativo promueve diferentes alteraciones bioquímicas, incluyendo la oxidación de proteínas, la generación de peróxidos de lípidos y la formación de especies nitrogenadas reactivas a partir del óxido nítrico, que contribuye a la nitrosilación intracelular, como la nitración de tirosina de proteínas ⁸⁴.

El estrés oxidativo juega un papel esencial en el desarrollo de la CMD en pacientes ^{69, 85-87} y en modelos experimentales de DM1 y DM2 (Tabla 2, Figura 3). En este contexto, un estrés oxidativo aumentado en tejido cardíaco de pacientes con DM2 se relacionó con cambios en los niveles

H₂O₂ mitocondrial y de proteínas modificadas con 3-nitrotirosina y 4-hidroxi-nonenal (HNE) ⁸⁵. Por contra, la sobreexpresión de MnSOD o catalasa se ha observado que atenúa el inicio de la disfunción mitocondrial y el deterioro de la contractilidad de los cardiomiocitos en ratones DM1 OVE26 ^{78, 88}.

4. *Lipotoxicidad*

Como ya se ha indicado anteriormente, la captación de intermediarios lipídicos está generalmente aumentada en CMD (Tabla 2, Figura 3). La consiguiente acumulación de metabolitos lipídicos citotóxicos en cardiomiocitos acelera su muerte relacionándose con un empeoramiento de la función contráctil del miocardio. Esto último ha sido estudiado en ratones transgénicos especialmente diseñados para estudiar los efectos relacionados con una mayor captación de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos, es decir, sobreexpresión de la proteína de transporte de ácidos grasos ⁸⁹, acil-CoA sintetasa 1 de cadena larga (ACS) ⁹⁰ y lipoproteína lipasa con la proteína de unión anclaje de glicosilfosfatidilinositol de unión (ratones LPL^{GPI}), las cuales precipitan el desarrollo de cardiomiopatía lipotóxica en esos modelos, incluso en ausencia de DM ⁹¹. Entre los mecanismos propuestos ⁹² se ha descrito una inducción en la generación de ROS, cambios en la composición de la membrana del RE que promueven el estrés del RE y una inducción de la apoptosis en respuesta a un aumento de la biosíntesis *de novo* de las ceramidas y remodelación de la membrana mitocondrial.

En ratones transgénicos ACS se sugirió que el aumento de la fisión mitocondrial, como consecuencia de las modificaciones postraduccionales de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial, podría también tener un papel en el desarrollo de cardiomiopatía lipotóxica ⁹³.

Aunque la acumulación cardíaca de triglicéridos se ha relacionado con en pacientes diabéticos ⁹⁴⁻⁹⁷ y modelos genéticos de diabetes en roedores ^{59, 97-100}, este lípido neutro solo representa un marcador de la acumulación de metabolitos lipídicos tóxicos y lipotoxicidad, ya que su acumulación no promueve *per se* los efectos nocivos ⁹².

5. *Inflamación*

En modelos experimentales de DM1 y DM2 el aumento de la inflamación en el miocardio es uno de los mecanismos alterados durante la progresión de la CMD ¹⁰¹⁻¹⁰⁶. La secreción de quimioquinas, citoquinas y de exosomas por parte de las células inflamatorias, podrían también contribuir en el desarrollo de la hipertrofia de los cardiomiocitos y al remodelado de la matriz extracelular del miocardio en DM.

Los miocardios de ratones y ratas con DM1 muestran signos de una mayor infiltración de leucocitos, mayores niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-1 β), y una actividad de la matriz degradante de colágeno metaloproteinasa disminuida, contribuyendo a un aumento de la inflamación y la fibrosis ¹⁰¹⁻¹⁰³. Consistentemente, datos similares han sido también reportados en modelos experimentales de obesidad alimentados con una dieta rica en grasas y con DM2 ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

6. *Productos finales de glicación avanzada (AGE)*

En condiciones de hiperglucemia, los AGE se forman tanto intra- como extracelularmente a través de la reacción de Maillard ¹⁰⁷. Los AGE son un grupo heterogéneo de compuestos que se forman tras la unión no enzimática de derivados del azúcar a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que altera la función fisiológica de las moléculas unidas ^{108, 109}. Por ejemplo, y entre otros procesos, los AGE promueven el entrecruzamiento de las moléculas de colágeno, lo que contribuye a aumentar la fibrosis y la disfunción contráctil ¹¹⁰. Además, la unión de los AGE a su receptor, RAGE

(Figura 3), contribuye a la activación de vías de señalización inflamatorias a través de la activación de la señalización de NF- κ B, induciendo la expresión de β -MHC. Consistentemente, la disfunción contráctil se atenuó y la expresión de β -MHC disminuyó en ratones db/db tras el bloqueo de la señalización de RAGE ¹¹¹. Efectos similares se han observado también en ratas con DM1 y DM2 después del tratamiento con el antioxidante dehidroepiandrosterona (DHEA), lo que sugiere también un papel importante por parte del estrés oxidativo en la activación de las vías mediadas por RAGE en condiciones diabéticas ¹¹².

Otros mecanismos mediados por RAGE son el aumento de la producción de ROS y de la señalización proinflamatoria ¹⁰⁸. Por ejemplo, la sobreexpresión de la enzima glioxalasa-1 (GLO1) en ratones, que acelera la reacción de transformación de metilglioxal, promueve además la disminución de los niveles de AGE derivados del metilglioxal y atenúa la aparición de IC después de un infarto de miocardio ¹¹³. Se describió además que estos ratones exhibieron una densidad vascular aumentada y una apoptosis de cardiomiocitos disminuida en miocardios de estos ratones transgénicos en comparación con los ratones no transgénicos, lo que se relacionó con un mayor reclutamiento de células progenitoras c-kit+ y su incorporación a la vasculatura ¹¹³.

En ratas con DM1 inducida por STZ, la administración de ALT-711, un agente que rompe los enlaces cruzados disminuyó los niveles cardíacos de AGE, restaurando la solubilidad del colágeno y disminuyendo su producción en DM1 ¹¹⁴. De manera similar, la supresión de la acción de RAGE mediada por siRNA corrigió la disfunción del ventrículo izquierdo en ratones con DM1 ¹¹⁵.

7. *Estrés del retículo endoplasmático*

La principal función fisiológica del RE es el almacenamiento de Ca^{2+} y el plegamiento de proteínas. La acumulación de proteínas desplegadas dentro del RE provoca el denominado estrés de RE, que puede inducir la muerte celular apoptótica en modelos experimentales de DM1 y DM2 ^{116, 117}.

Numerosos estudios sugieren un papel causal por parte del estrés oxidativo en la inducción del estrés del RE en DM ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Consistentemente, el estrés del RE se encuentra aumentado en diferentes tejidos en condiciones de DM e influye sobre otros procesos como la apoptosis y autofagia ¹²⁰ y posiblemente pueda tener un papel en el desarrollo de CMD.

8. *Aumento de la muerte celular*

El aumento de la muerte de cardiomiocitos apoptóticos y necróticos se ha estudiado en pacientes ^{85, 121, 122} y modelos experimentales de DM1 y DM2 ^{98, 123-127}. Entre los mecanismos propuestos que desencadenan la muerte celular constan una mayor activación de caspasa ¹²¹, producción de ROS ¹²⁵, estrés del RE ¹²⁷, y de vías proapoptóticas dependientes de mitocondrias y receptores de muerte celular ¹²⁴, activación de RAAS ¹²⁶, y deficiencia de leptina ¹²³. En este último caso, el desarrollo de apoptosis se redujo en ratones ob/ob tratados con leptina.

Consecuencias estructurales y funcionales relacionadas con CMD

La inflamación sistémica, la hiperglucemia y la dislipidemia asociadas con la DM aceleran el desarrollo de fibrosis e hipertrofia cardíacas, contribuyendo al remodelado y disfunción del ventrículo izquierdo característica de CMD ²⁹. En condiciones diabéticas, los AGE creados por la exposición de proteínas y lípidos a niveles altos de glucosa se entrecruzan con las proteínas de la matriz extracelular, lo que altera el

recambio normal por parte de las metaloproteinasas de la matriz lo que resulta en un aumento de la rigidez cardíaca. Esto último habitualmente se manifiesta como una disfunción diastólica temprana del ventrículo izquierdo ^{29, 128, 129}. Los signos de remodelado y disfunción cardíaca más característicos de CMD se describen a continuación.

1. *Aumento de fibrosis*

El desarrollo de fibrosis miocárdica es uno de los principales factores implicados en el remodelado y disfunción miocárdica en la CMD. La acumulación de colágeno es un signo de fibrosis, detectándose tanto en zonas miocárdicas perivasculares como en las miofibras de miocardios de sujetos con DM ¹³⁰. Consistentemente, se han descrito elevaciones en los depósitos de colágeno de tipo III, pero no el de tipo I o IV, en las biopsias de miocardio de pacientes con DM2 sin antecedentes previos de hipertensión ni de arteriosclerosis en las arterias coronarias ¹³¹. Asimismo, las concentraciones séricas del propéptido carboxi-terminal del procolágeno tipo I, un marcador de fibrosis miocárdica, se encontraron aumentadas en pacientes con DM2 con disfunción diastólica ¹³².

Los ratones son especialmente resistentes al desarrollo de fibrosis miocárdica. Aun así, se ha descrito un aumento de la fibrosis en algunos modelos animales de DM1 ^{114, 133-135} y DM2 ^{98, 136}. En el caso de los ratones db/db aunque son muy resistentes esta se puede además inducir mediante ciertos tratamientos ¹³⁷.

Como posibles mecanismos responsables del aumento de la fibrosis y de tejido conjuntivo en miocardio, se incluyen la remodelación de la matriz extracelular mediada por la exposición a niveles aumentados de AGE, el aumento de la señalización mediada por el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el aumento de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo y la disminución de la expresión de MMP2,

lo que da como resultado una degradación atenuada de la matriz extracelular ¹³⁴.

2. *Disfunción diastólica*

Una característica clínica clave de la CMD es la disfunción diastólica con fracción de eyección preservada (HFpEF, del inglés *Heart Failure with preserved Ejection Fraction*), que puede preceder a la aparición tardía de disfunción sistólica, es decir, insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (HFrEF, del inglés *Heart Failure with reduced Ejection Fraction*).

Existen varios mecanismos que contribuyen a la disfunción diastólica, incluyendo los AGE, el aumento de la fibrosis y la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} (Figura 2). La disfunción diastólica puede estar presente en hasta el 60-75% de los pacientes diabéticos, y es aún más evidente en condiciones de cardiomiopatía con origen isquémico sumado a la presencia de hipertensión ¹³⁸⁻¹⁴⁰.

La disfunción diastólica del ventrículo izquierdo puede aparecer en condiciones de resistencia a la insulina incluso antes del inicio de la DM2, independientemente de la edad, la presión arterial y el índice de masa corporal ¹⁴¹. Se ha reportado que un 24% de los pacientes con DM2 presentan disfunción sistólica, después de excluir a los pacientes con arteriopatía coronaria ¹⁴². También se ha descrito disfunción diastólica en pacientes con DM1 ¹⁴³⁻¹⁴⁵; sin embargo, los hallazgos sobre la función sistólica en DM1 son inconsistentes, reportándose en función del estudio signos de función sistólica preservada ^{144, 146} o aumentada ¹⁴⁷. Las diferencias entre pacientes con DM1 y DM2 pueden ser una consecuencia de la selección de pacientes o también deberse al efecto del tratamiento de los pacientes con DM1 con insulina exógena, lo que puede normalizar el entorno sistémico.

La función contráctil cardíaca también se ha analizado en diferentes modelos animales de DM1 y DM2, observándose disfunción tanto diastólica como sistólica en algunos de los modelos investigados (Tabla 1). Los ratones genéticamente obesos db/db y ob/ob exhibieron una disfunción diastólica severa, como lo demuestra la disminución de la relación entre las velocidades temprana (E) y tardía (A) (E/A)^{99, 148, 149}. Las propiedades contráctiles solo se vieron ligeramente afectadas en los ratones ob/ob¹⁵⁰, mientras que estas mostraron un mayor grado de afectación en ratones db/db a las 12 semanas de edad¹⁴⁹. Es importante destacar que la mayoría de los estudios con modelos animales no utilizaron tratamientos para normalizar las concentraciones séricas de glucosa, lo que seguramente agrave aún más el impacto de la hiperglucemia y las alteraciones metabólicas en el desarrollo de la disfunción contráctil.

3. *Hipertrofia cardíaca*

Otra característica clínica de la CMD es la hipertrofia del ventrículo izquierdo, especialmente en DM2. En estudios epidemiológicos se ha descrito una asociación entre la DM, el grosor de la pared y la masa del ventrículo izquierdo pero solo en mujeres, no en hombres¹⁵¹ (*Framingham Heart Study* y *Framingham Offspring Study*); sin embargo, en otro estudio, *Strong Heart Study* se observó un aumento de la masa del ventrículo izquierdo y el grosor de la pared en ambos sexos¹⁵².

Otras evidencias relacionan la hipertrofia cardíaca con la CMD. Por ejemplo, la prevalencia de signos de remodelado y disfunción cardíaca se encuentra aumentada en sujetos con DM2 con obesidad¹⁵³, lo que sugeriría que el exceso de peso corporal constituye un factor de riesgo añadido en el remodelado cardíaco. Por otro lado, la hipertrofia del ventrículo izquierdo aumenta el riesgo futuro de padecer IC, especialmente en presencia de hipertensión¹⁵¹. Aunque la hipertrofia del ventrículo

izquierdo no se ha relacionado con los niveles de glucosa alterados en ayunas ¹⁵², no se descartaría que el remodelado cardíaco pudiera atribuirse a otros cambios metabólicos asociados con tiempos de duración de la DM más prolongados.

La hiperactivación de la cascada de señalización de la insulina en pacientes obesos y con DM2 y un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes se han relacionado con hipertrofia del ventrículo izquierdo ^{54, 154}. Es interesante destacar que no hay signos de hipertrofia miocárdica en sujetos con DM1 ^{144, 146, 147} y modelos animales de DM1 (Tabla 2). Asimismo, la eliminación genética del receptor de insulina disminuye el tamaño cardíaco ⁴⁹. En conjunto, las diferencias entre ambos contextos diabéticos posiblemente sugieran el papel de la resistencia a la insulina como mecanismo patológico de la hipertrofia del ventrículo izquierdo en la obesidad y la DM2.

Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD

Las enfermedades cardiometabólicas promueven cambios en el metabolismo, la distribución y los perfiles de los esfingolípidos en múltiples órganos y tejidos ¹⁵⁵. El metabolismo y la señalización de los esfingolípidos, así como su rol como posibles candidatos a biomarcadores de riesgo de enfermedad cardiovascular o dianas terapéuticas han sido estudiados exhaustivamente ^{156, 157}.

Como tales, se ha descrito que los esfingolípidos presentan una misión estructural, como componentes de las membranas biológicas, pero también son moléculas de señalización e intervienen en la regulación de diversas funciones celulares ¹⁵⁸. En cuanto a la estructura molecular, los esfingolípidos constan de un ácido graso unido a una esfingosina unida mediante un enlace amida ¹⁵⁹. Existe una gran variedad en función de si

presentan un grupo fosfato, i.e., fosfoesfingolípidos, o si tienen hidratos de carbono como partes de su estructura, i.e., glucoesfingolípidos.

En los últimos años, en múltiples estudios se han relacionado moléculas como las ceramidas, un subgrupo de esta clase de moléculas, con condiciones metabólicas adversas como la obesidad y la diabetes ^{156, 160, 161}, así como con el desarrollo de arteriosclerosis ¹⁶²⁻¹⁶⁴ y enfermedad cardiovascular ^{165, 166}. A nivel del miocardio, esta clase de esfingolípidos bioactivos ejercen un papel dinámico en funciones esenciales en el remodelado cardíaco y funcionalidad cardíacas. Consistentemente, su concentración circulante también se ha encontrado elevada en diferentes afecciones relacionadas con daño miocárdico ¹⁶⁷.

Por otro lado, la acción de otro esfingolípidos, la esfingosina 1-fosfato (S1P), también se ha estudiado en los mismos contextos cardiometabólicos ^{157, 168-171}, aunque a diferencia de las ceramidas, se le atribuye un papel en general cardioprotector ^{168, 172}.

1. *Biosíntesis de esfingolípidos*

La biosíntesis de esfingolípidos comienza con la condensación de un aminoácido con acil-CoA para producir un aminoalcohol, también denominada base esfingoide, que es el componente estructural que define la clase de esfingolípidos ¹⁵⁹. La base esfingoide puede modificarse posteriormente mediante acilación, fosforilación, glicosilación y/o adición de otros grupos funcionales ^{159, 173}. Estas modificaciones estructurales generan cientos de subespecies de esfingolípidos involucradas en la mayoría, si no en todos, los aspectos principales de la regulación celular, incluida la división celular y la senescencia, la migración, la diferenciación, la apoptosis, la autofagia, la absorción de nutrientes, el metabolismo y la síntesis de proteínas ¹⁵⁹.

Las ceramidas son una clase de moléculas derivadas de la vía metabólica de los esfingolípidos ¹⁵⁹. Como resultado de su metabolización se obtienen otros esfingolípidos también con propiedades biológicas asociadas, como la ceramida 1-fosfato, la esfingosina (Sph, del inglés *Sphingosine*) y la S1P (esfingosina 1-fosfato) (Figura 3).

El contenido celular de S1P está controlado principalmente por enzimas necesarias para la síntesis y degradación de ceramidas, que están presentes en la mayoría de las células de mamíferos, incluidos los cardiomiocitos ¹⁷⁴. Las ceramidas son los principales precursores sintéticos de S1P y otros esfingolípidos intracelulares, como la esfingosina y la esfingomielina ¹⁷⁵. Las ceramidasa neutras pueden convertir las ceramidas en esfingosina, que posteriormente pueden ser fosforiladas por dos esfingosina quinasas diferentes (SphKs; isoformas 1 y 2) para generar S1P ¹⁷⁶. A su vez, S1P puede desfosforilarse mediante la acción de dos fosfatasa S1P (SPP) para regenerar de nuevo Sph, o escindirse por la liasa S1P, generando etanolamina-fosfato y hexadecenal, abandonando de esta manera la ruta metabólica de los esfingolípidos ^{177, 178} (Figura 4).

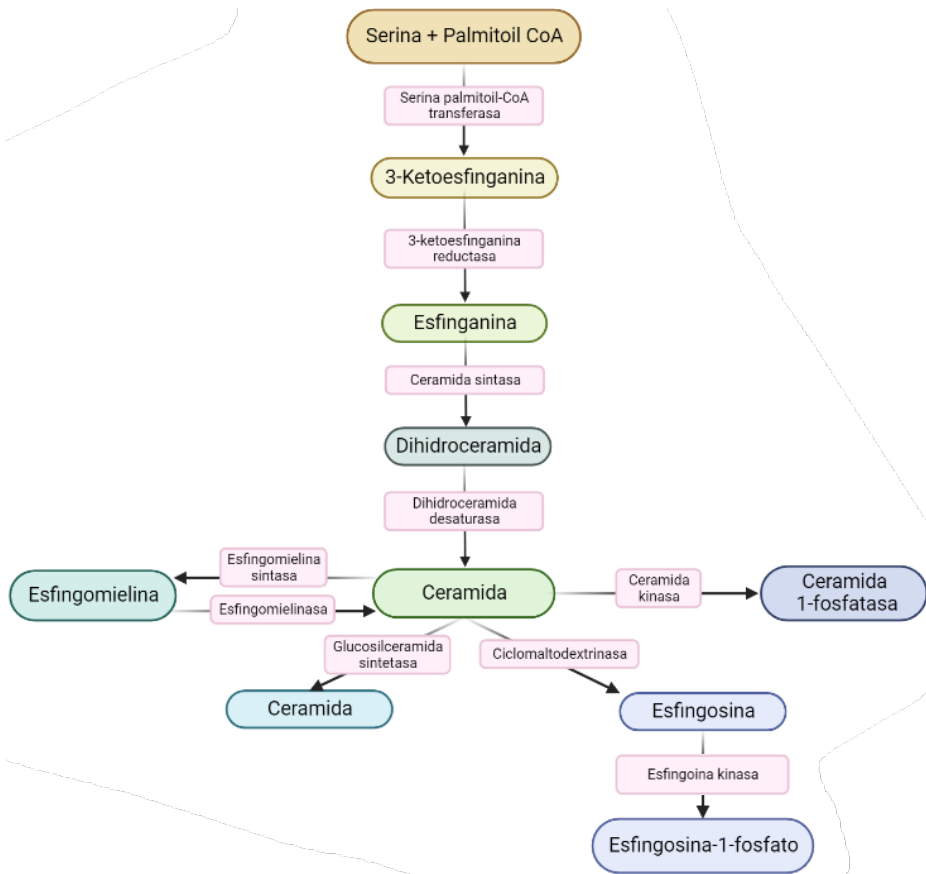


Figura 4. Vía biosintética y metabolismo de los esfingolípidos.

Abreviatura: CoA, coenzima A. Figura adaptada a partir de la publicada previamente ¹⁷⁹.

Dadas sus múltiples funciones reguladoras, alteraciones en los niveles de ciertas especies de esfingolípidos han sido relacionadas con muchas enfermedades, incluida la enfermedad cardiometabólica y han permitido la identificación de posibles nuevos candidatos a diana terapéutica en el contexto de las enfermedades cardiovasculares. Así, por ejemplo, la inhibición de la producción de esfingolípidos previene o retrasa la aparición de estas enfermedades ^{180, 181}, mientras que la activación de la ceramidasa previene contra el daño cardíaco tras la apoptosis ¹⁸². Diferentes estudios

sugieren también un papel activo por parte de las ceramidas en el desarrollo de lipotoxicidad en miocardio ^{180, 183-185}.

Ceramidas

En condiciones fisiológicas normales, pueden encontrarse en función del poder de detección de las metodologías utilizadas una variedad de especies de ceramidas, comprendiendo desde especies de cadena corta (Cer 6:0) hasta cadena muy larga (Cer 26:0). Las ceramidas de cadena más larga son las especies de ceramidas predominantes en células de mamíferos. La biosíntesis de ceramida puede ocurrir a través de tres vías distintas: [i] de *novo*, [ii] hidrólisis de esfingomielina, o [iii] mediante interconversión a partir de otros precursores de esfingolípidos (Figura 4).

La síntesis *de novo* ocurre en el RE e involucra a las ceramida sintasas (CerS), así como a la serina palmitoil-transferasa (SPT), que cataliza el paso limitante de la reacción, y cuya acción es inhibida por el fármaco miriocina. En otra vía, la esfingomielinasa (SMasa) hidroliza la esfingomielina para formar ceramida. Como las SMasa, las ceramidasa también existen en tres formas distintas: ácida, neutra y alcalina. La presencia de uno u otro subtipo depende de su localización subcelular, función y pH óptimo de acción. En general, las SMasa ácidas y las ceramidasa funcionan en los lisosomas, las enzimas neutras se distribuyen por la membrana plasmática, y las enzimas alcalinas se localizan preferentemente en el aparato de Golgi o el RE ¹⁸⁶. Además, las CerS catalizan preferentemente ciertos sustratos grasos de acil-CoA para producir diferentes subtipos de ceramida ^{186, 187}.

Las dihidroceramidas son los metabolitos precursores de las ceramidas en la ruta de biosíntesis de esfingolípidos *de novo*. Las CerS son las principalmente involucradas en la reacción de síntesis de dihidroceramidas al condensar esfinganina y acil-CoA. Las CerS constituyen una familia de

hasta seis isoformas diferentes (CerS1-6) que muestran especificidad para ciertas longitudes de cadena de acil-CoA. Por último, las ceramidas se forman a partir de dihidroceramidas por la acción de la enzima dihidroceramida desaturasa ¹⁸⁸.

1. *Distribución y función*

Además de ser un componente de la membrana plasmática y de las lipoproteínas, las ceramidas también forman parte de las membranas mitocondriales y juegan un papel determinante en su funcionalidad y homeostasis. Es interesante resaltar además que las mitocondrias y las membranas asociadas a ellas mantienen el potencial de generar ceramidas *in vitro* ¹⁸⁹; siendo esto último debido a la presencia de diferentes CerS (CerS2, CerS4 y CerS6) presentes en las membranas mitocondriales internas y externas de este orgánulo celular.

En ciertas condiciones una acumulación excesiva de estas moléculas induce disfunción mitocondrial ^{190, 191}, pudiendo inhibir la capacidad oxidativa mitocondrial, la síntesis de ATP a través de la inhibición de la cadena de transporte de electrones y una mayor generación de ROS ^{190, 192-194}. Además, otros estudios muestran que las ceramidas pueden alterar o casi eliminar el potencial de membrana mitocondrial dependiente de la respiración ^{190, 195, 196}, a través de la permeabilización de las membranas mitocondriales interna y externa ¹⁹⁰. Consistentemente, la acumulación de ceramidas inhibe el funcionamiento normal de la cadena respiratoria *in vivo* ¹⁹⁷. Por el contrario, la reducción de ceramidas aumenta la actividad del complejo mitocondrial (complejo IV en tejido adiposo blanco subcutáneo, complejos II y IV en tejido adiposo marrón), así como la respiración en el tejido adiposo blanco subcutáneo, el tejido adiposo marrón y el cerebro en modelos de ratón de obesidad inducida por dieta ¹⁹⁸. En este sentido, la disminución del contenido de ceramidas en esos tejidos también se

relacionó con el aumento de la tasa relativa de gasto respiratorio en ese mismo modelo animal ¹⁹⁹.

2. *Efectos cardiometabólicos relacionados con las ceramidas*

El desarrollo de resistencia a la insulina en tejido adiposo y muscular es un paso clave en la progresión del síndrome metabólico, la obesidad y la DM ⁹. Las concentraciones de ceramidas en plasma, tejido adiposo y músculo esquelético están frecuentemente elevadas en pacientes con obesidad y DM2 ²⁰⁰⁻²⁰²; así como en muestras de tejido adiposo, hígado, músculo esquelético y plasma de modelos animales de resistencia a la insulina ^{200, 203-205} y en seres humanos ²⁰⁶.

Existen diferentes evidencias que sugieren que los niveles de ceramida en plasma, tejido adiposo, hígado y músculo esquelético se encuentran negativamente correlacionados con un patrón alterado de señalización a la insulina en humanos y en modelos animales ^{200-202, 205, 207}. Primero, las ceramidas inhiben la vía de señalización Akt, cuya activación se encuentra modulada por la vía de señalización de la insulina ²⁰⁸. Segundo, los niveles de ceramida en tejido adiposo están más elevados en pacientes con una mayor acumulación de lípidos hepáticos que en aquellos con hígados sanos ²⁰¹. Tercero, en islotes pancreáticos, la disminución del contenido en ceramidas previene la lipotoxicidad inducida por su acumulación excesiva, preservando la secreción de insulina y glucagón ¹⁰. Cuarto, la ceramida unida a las LDL también aumenta la resistencia a la insulina en las células musculares y aumenta la expresión de genes inflamatorios en macrófagos, incluidos IL-6 y TNF α ²⁰⁰. Quinto, el contenido de ceramida en el músculo esquelético se correlaciona negativamente con la sensibilidad a la insulina en diferentes estudios clínicos ^{207, 209}.

Las cantidades relativas de especies particulares de ceramida en estados de resistencia a la insulina varían según el estudio. En un estudio clínico,

las ceramidas del músculo esquelético Cer 16:0 y Cer 18:0 se han correlacionado negativamente con la sensibilidad a la insulina ²⁰⁷. Sin embargo, en otro estudio se demostró que la ceramida Cer 18:0 plasmática estaba más aumentada en los participantes obesos con DM2 que en los controles sanos, pero la ceramida Cer 24:0 era más abundante ²⁰². El impacto relativo de cada especie específica de ceramida sobre la resistencia a la insulina está lejos de ser resuelto.

La producción de ceramida es un factor importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina a través de los glucocorticoides y los ácidos grasos saturados, pero no a través de los ácidos grasos insaturados ^{181, 210}. Los glucocorticoides inducen la producción de metabolitos de esfingolípidos al promover la expresión de las enzimas CerS y glucosilceramida sintasa, que producen ceramidas. Por lo tanto, el aumento de la actividad de la CerS como de la esfingomielinasa ácida (aSMasa), inducida por los glucocorticoides podría provocar un aumento de los niveles de ceramida ^{211, 212}.

Los ácidos grasos saturados también promueven la acumulación de ceramida en el hígado y músculo esquelético, así como resistencia a la insulina ¹⁸¹. Por el contrario, la reducción de ceramidas revierte las consecuencias metabólicas del depósito de ceramidas en los tejidos. La sobreexpresión de ceramidasa ácida en ratones, bajo el control del promotor de adiponectina, resulta en una disminución de las ceramidas en la grasa visceral y subcutánea, el hígado y el suero, en particular las especies de ceramida Cer 16:0 y Cer 18:0 ^{181, 213}. Después de la inducción de la expresión de ceramidasa ácida, los ratones mostraron una mejoría en la esteatosis hepática y en la señalización de la insulina y el metabolismo de la glucosa, no solo a través de un aumento de la tolerancia oral a la glucosa y a la insulina; también, a través de un aumento de las

tasas de infusión de glucosa y la disminución de la producción de glucosa hepática ²¹³.

La inducción de la disfunción mitocondrial por parte de ceramidas parece jugar un papel en el desarrollo del síndrome metabólico y sus condiciones asociadas. Varios estudios implican específicamente a las ceramidas producidas por la enzima ceramida sintasa 6 (CerS6). En este sentido, los ratones ob/ob, tienen niveles elevados de CerS6 en el hígado, tejido adiposo marrón y tejido adiposo blanco subcutáneo, pero no en el tejido adiposo blanco gonadal ²¹⁴, mientras que la producción de la ceramida Cer 16:0 gracias a la acción de CerS6 promueve la inhibición de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos en tejido adiposo marrón e hígado ²¹⁵. En ratones con aumento de peso inducido por una dieta rica en grasas, solo la CerS6 aumentó en las mitocondrias y las membranas asociadas a las mitocondrias, pero no la ceramida sintasa 5 (CerS5). La CerS6 también interactúa con el factor de fisión mitocondrial (MFF) en la inducción de la fisión mitocondrial, mientras que la desactivación de cualquiera de estas proteínas normaliza la estructura mitocondrial alterada por una dieta rica en grasas ²¹⁶. Consistentemente, tanto en ratones ob/ob como obesos inducidos por una dieta rica en grasas, pero no en ratones db/db, que carecen del receptor de leptina, se hallaron niveles de ceramida Cer 16:0 elevados en hígado y plasma. Por otro lado, la ablación de CerS6 y la posterior reducción del contenido en ceramida Cer 16:0 en un 50%, tanto en ratones ob/ob como en ratones obesos tras ser alimentados con una dieta rica en grasas. Esta modificación también corrigió los niveles de glucosa elevada en sangre y la resistencia a la insulina, y causaron una pérdida de peso del 25% no asociado a cambios en la pauta de ingesta ²¹⁴.

Además de la CerS6, también se han descrito otras CerS con un papel en el desarrollo de la disfunción metabólica. En la CMD, las ceramidas

derivadas de ceramida sintasa 2 (CerS2) y CerS5, incluidas las ceramidas de cadena larga, se han relacionado con un aumento de la mitofagia y la resistencia a la insulina ¹⁹⁵. En ratones DIO, la ceramida sintasa 1 (CerS1) y C18:0 están elevadas en el músculo esquelético, y la inactivación global de CerS1, así como su deficiencia específicamente en músculo esquelético, resulta en una mejora en la tolerancia a la insulina a través del aumento del factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) en el músculo ²¹⁷.

3. *Ceramidas en la enfermedad cardiovascular*

Las ceramidas tienen un papel bien establecido en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, incluida la arteriosclerosis ^{218, 219}, la cardiomiopatía ^{180, 185, 219}, la IC ^{219, 220} e infarto de miocardio ^{219, 221, 222}. También presentan un papel muy relevante en el contexto de la enfermedad cerebrovascular ^{219, 221}.

A partir de los estudios que utilizan modelos experimentales de enfermedad cardiovascular se deduce que las ceramidas no solo son biomarcadores de la salud cardiovascular, sino que también juegan un papel causal en el metabolismo y la enfermedad cardiovascular ^{156, 180, 223-227}. Los estudios en modelos animales revelan que la inhibición farmacológica de la síntesis de ceramidas previene la IC secundaria a una cardiomiopatía isquémica y también previene contra la remodelación ventricular, la fibrosis y la infiltración de macrófagos después del infarto de miocardio ^{180, 224, 225}. Además, otro dato de interés es que estas intervenciones dirigidas a reducir las ceramidas también resuelven muchas alteraciones subyacentes a las enfermedades cardiovasculares, como la dislipidemia, la resistencia a la insulina, la hipertensión, la arteriosclerosis y la esteatosis hepática ^{181, 228-231}.

A partir de manipulaciones de la ruta de síntesis de ceramidas *de novo* sugieren además que ciertas especies de ceramidas son perjudiciales, mientras que otras pueden ser benignas o beneficiosas^{215, 217, 232, 233}. Así, por ejemplo, aquellas que contienen la cadena de acilo C16 o C18^{215, 217, 232} y un doble enlace (es decir, ceramidas, no dihidroceramidas)²³¹ en el esqueleto del esfingolípido son particularmente dañinas. Finalmente, los estudios en modelos experimentales revelan que la degradación de ceramidas es un medio principal por el cual los receptores de adiponectina, que tienen actividad ceramidasa²³⁴, ejercen sus acciones antidiabéticas, cardioprotectoras y sensibilizantes a la insulina^{182, 234, 235}. En conjunto, estos datos sugieren a las ceramidas como unos de los metabolitos más tóxicos con tendencia a acumularse en condiciones metabólicas alteradas.

Existe una fuerte correlación entre enfermedad cardiovascular y niveles elevados de dihidroceramidas. Tanto las dihidroceramidas como las ceramidas se correlacionan con la liberación de la citoquina inflamatoria IL-6, pero solo las dihidroceramidas se correlacionan con la liberación de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β)^{219, 236}. En este sentido, los niveles de dihidroceramidas se encontraron elevados en placas arterioscleróticas²³⁶, así como en modelos de hipoxia cerebral^{237, 238}. Sin embargo, el papel que desempeña este aumento de dihidroceramidas en la estabilidad de la placa arteriosclerótica aún se desconoce, ya que la adición extracelular de dihidroceramidas a las células del músculo liso aórtico humano no indujo apoptosis, mientras que la adición de ceramidas sí lo hizo²³⁶, sugiriendo a las ceramidas como posible diana terapéutica. En este mismo sentido, el aumento en el contenido de ceramidas se ha establecido como un componente clave de la lesión tisular como consecuencia de la isquemia y la subsiguiente reperfusión después de un accidente cerebrovascular, durante la cual se produce una acumulación de ceramidas en las mitocondrias y el RE debido a la síntesis *de novo*^{197, 239}. Las biopsias de miocardio de pacientes con IC también revelan niveles

elevados de contenido de ceramidas. Un tratamiento común para la IC es la implantación de un dispositivo de asistencia ventricular izquierda, que compensa los defectos derivados de esta condición, lo que lleva a una disminución de la carga mecánica en el tejido cardíaco. Curiosamente, esta intervención se relacionó con una mejora de los niveles de ceramida en el miocardio y en la tolerancia a la insulina general y cardíaca ²⁴⁰.

Un metaanálisis de tres estudios clínicos prospectivos en Finlandia, Suiza y Noruega que dieron seguimiento a pacientes con enfermedad cardiovascular encontró que los niveles de ceramidas, en particular ciertas especies de ceramida, se correlacionaron positivamente con la muerte por causas cardiovasculares, independientemente de otros marcadores de lípidos, incluidos el colesterol y la proteína C reactiva ²⁴¹. De este estudio también se concluyó que las proporciones de especies de ceramidas de cadena larga (Cer 16:0 y Cer 18:0) estaban más fuertemente correlacionadas con resultados cardiovasculares adversos, a diferencia de otras especies de ceramidas de cadena más larga (Cer 24:0) ²⁴¹. Otra conclusión relevante de este estudio fue que los niveles relativos de ciertas especies de ceramidas son clínicamente más relevantes que los cambios brutos ^{241, 242}. Las proporciones de (Cer 16:0)/(Cer 24:0), (Cer 18:0)/(Cer 24:0) y (Cer 24:1)/(Cer 24:0) se correlacionaron negativamente con la enfermedad coronaria y mortalidad ²⁴¹. Como prueba de la utilidad como biomarcador de estas especies de ceramidas, en otro estudio más reciente se observó que algunas especies de esfingolípidos séricas son per se marcadores de enfermedad de las arterias coronarias, independientes del colesterol ²²⁷, confirmándose de este modo las fuertes correlaciones existentes entre estas especies y los resultados cardíacos adversos. Por todo ello, la determinación de niveles de ceramidas en plasma podría usarse como biomarcadores clínicos para predecir el riesgo de muerte cardiovascular.

Las ceramidas también están fuertemente relacionadas con la disfunción mitocondrial miocárdica. En cultivos de cardiomiocitos, se descubrió que la ceramida Cer 2:0 altera el potencial de la membrana mitocondrial y provoca la fragmentación mitocondrial, lo que conduce a la activación de procesos apoptóticos de estos orgánulos ¹⁹⁶. También se encontraron ceramidas aumentadas y la apoptosis resultante en cardiomiocitos de modelos de ratón con varios tipos de cardiomiopatía ^{90, 180}. Un modelo de ratón de DM1 y CMD mostró una mayor acumulación de ceramida en el miocardio, acompañada por una concomitante disfunción diastólica ²⁴³. En un modelo de ratón de DM2 y CMD, las ceramidas producidas a través de la acción de CerS2 y CerS5, incluidas las ceramidas de cadena larga, provocaron un aumento de la mitofagia y la hipertrofia lipotóxica en cardiomiocitos ¹⁹⁵. En ratas, las mitocondrias del tejido cardíaco reperfundido acumularon niveles de ceramida más altos que las de sus controles experimentales ²⁴⁴. Esta correlación también se alcanzó a ver en sujetos humanos con enfermedad cardiovascular. El tejido miocárdico de pacientes con IC reveló un mayor contenido en ceramidas, así como una expresión reducida de PGC-1 α , lo que indicaría una alteración de la respiración oxidativa en las mitocondrias ²⁴⁰. En todas las especies, desde ratones/ratas hasta humanos, las ceramidas están fuertemente asociadas con la enfermedad cardiovascular a través de su acción sobre la disfunción mitocondrial.

Desde un punto de vista nutricional, es también importante destacar el papel por parte de ciertas dietas sobre el desarrollo de disfunción mitocondrial y la cardiomiopatía inducida por ceramidas. En este contexto, en ratones que desarrollaron CMD causada por una dieta rica en grasas preparada a partir de la grasa de la leche, en lugar de la habitualmente empleada, manteca de cerdo, presentaron niveles más elevados de ceramida Cer 14:0 en el tejido cardíaco. También desarrollaron una disfunción cardíaca más rápidamente que los alimentados con una dieta

rica en grasas hecha a base de manteca de cerdo. El tratamiento con miriocina corrigió los parámetros del electrocardiograma previamente anormales en ratones alimentados con una dieta rica en grasas a base de grasa láctea, y también evitó el desarrollo de hipertrofia del ventrículo izquierdo y de los cardiomiocitos ²⁴⁵. En conjunto, estos estudios de modelos animales y pacientes implican fuertemente a las ceramidas en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad cardiovascular.

Efectos clínicos de la disfunción inducida por ceramida y la adiponectina

1. Insulinorresistencia

En niñas y adolescentes con DM2, así como en controles sanos, los niveles plasmáticos de adiponectina y ceramida plasmáticos suelen estar inversamente correlacionados. En las pacientes diabéticas que presentaron obesidad se observó que tenían niveles de especies de ceramida, incluidas Cer 18:0, Cer 20:0, Cer 22:0 y Cer 24:1, más elevados que la de los sujetos diabéticos no obesos ²⁴⁶. Estos hallazgos se replicaron en pacientes adultos diabéticos obesos en comparación con controles adultos obesos no diabéticos. Así, el diagnóstico de DM2 se correlacionó con un aumento de esfingolípidos, dihidroceramidas (dhCer) total, dhCer 16:0 y dhCer 24:0 y ceramidas (Cer total y Cer 16:0) ¹⁹⁸. Las dhCer estaban elevadas en pacientes hasta nueve años antes de su diagnóstico de diabetes, lo que demuestra el valor de las dihidroceramidas como un signo temprano de disfunción metabólica ²⁴⁷.

2. Relación de los niveles de ceramidas con el desarrollo de cardiomiopatía lipotóxica

La acumulación de lípidos neutros en o alrededor del miocardio se observa en modelos humanos o animales con insuficiencia cardíaca no isquémica

²⁴⁸⁻²⁵³ y se supone que el exceso de lípidos contribuye al desarrollo de disfunción cardíaca ^{155, 254}, aunque a largo plazo ²⁵⁵.

Se han desarrollado varios modelos animales transgénicos de cardiomiopatía lipotóxica (Tabla 1). Algunos de ellos se basan en la sobreexpresión específica en cardiomiocitos de la acil coenzima A sintetasa 1 de cadena larga (MHC-ACS1) ⁹⁰, proteína transportadora de ácidos grasos 1 (MHC-FATP1) ⁸⁹ y la forma anclada a la membrana celular de LpL (LpL^{GPI}) ⁹¹ y se caracterizan por presentar un aumento de la captación de ácidos grasos del miocardio, el depósito de lípidos y desarrollo de cardiomiopatía.

La acumulación de vesículas de lípidos neutros intracelulares o la acumulación de ácidos grasos también pueden producir efectos tóxicos directos sobre la función miofibrilar ²⁵⁶. Los ácidos grasos pueden inducir apoptosis ⁹⁸ en respuesta al aumento de los niveles de ROS como consecuencia de la oxidación de estos lípidos ²⁵⁶ y la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa C ²⁵⁷. A su vez, los ácidos grasos también inducen la síntesis de ceramidas, que intervienen en varios procesos tóxicos ¹⁸⁰. Aunque todavía no está claro qué metabolitos lipídicos causan directamente la cardiomiopatía, la acumulación de ceramidas en el miocardio se correlaciona con estos eventos fisiopatológicos y la disfunción cardíaca en varios modelos experimentales (Tabla 3) ^{90, 180, 258}.

Además de su acumulación en forma de vesículas intracelulares de triglicéridos, otra ruta para utilizar el excedente de ácidos grasos es a través de su transformación a ceramidas. El aumento de los niveles miocárdicos de ceramidas se asoció con disfunción diastólica en ratones Akita Ins2 (WT/C96Y) y ratas Zucker diabéticas grasas (ZDF) ^{98, 243, 259}. En conjunto estos datos sugieren que los niveles de ceramida miocárdica se

correlacionan con el desarrollo de la disfunción cardíaca en condiciones de obesidad y DM.

Tabla 3. Ceramidas cardíacas, apoptosis de cardiomiocitos y función cardíaca en modelos animales de cardiomiopatía lipotóxica, DM y obesidad

Modelo animal	Cambios en el contenido cardíaco de ceramidas	Función cardíaca	Referencias
Ratones MHC-ACS1	↑	↓	108
Ratones LPL ^{GPI}	↑	↓	109
Ratones MHC-PPAR α	↑	↓	309
Ratones Akita Ins2	↑	↓	294
Ratas obesas/diabéticas Zucker	↑	↓	116
Ratones ob/ob	↑	Sin cambio	311
Ratas alimentadas con una dieta rica en grasas	↑	↓	311
Ratones db/db	↑	↓	234

Esfingosina 1-fosfato

1. Efectos cardioprotectores de S1P

La acumulación intracelular de ceramidas puede contribuir a la patogenia de la disfunción cardíaca. Por el contrario, la S1P muestra acciones antagónicas en relación con la ceramida y ejerce acciones favorables sobre la fisiología y la supervivencia de los cardiomiocitos ^{261, 262}.

La concentración plasmática de S1P a menudo se encuentra frecuentemente alterada en sujetos diabéticos y obesos ^{171, 263}. También se ha encontrado que puede verse comúnmente relacionada con cambios en sus perfiles de lipoproteínas ^{264, 265}, siendo una de las líneas de investigación centrada en la S1P unida a HDL ²⁶⁶. En este contexto, se ha demostrado que una serie de acciones cardioprotectoras de HDL estarían mediadas por la interacción de S1P unida a lipoproteínas con las células, incluidas las de las células endoteliales, los macrófagos y los cardiomiocitos ^{266, 267}. Las HDL son disfuncionales en sujetos diabéticos

²⁶⁸, y posiblemente, un contenido alterado de S1P en esta fracción podría ser en parte responsable de la cardiomiopatía relacionada con la DM. Entre los efectos cardiovasculares favorables por parte de la S1P vehiculada por las HDL, se cuentan acciones celulares tales como la supresión de procesos oxidativos/inflamatorios, apoptosis y disfunción endotelial ²⁶⁹. En este sentido, la S1P unida a HDL puede ser determinante de la acción biológica de S1P al facilitar la presentación a receptores específicos ²⁷⁰.

La apolipoproteína M (ApoM), en virtud de su capacidad para unirse a S1P, también podría contribuir a los efectos cardioprotectores beneficiosos de HDL ²⁶⁶. De hecho, la sobreexpresión de ApoM protege contra el desarrollo de arteriosclerosis ²⁷¹. En general, estos datos sugieren que la ApoM unida a S1P, en lugar de la S1P total unida a otros transportadores, como la albúmina, podría ser fundamental para conferir protección contra la arteriosclerosis ²⁶⁷. Aunque no se determinó el contenido de S1P en el HDL de ratones que sobreexpresan ApoM ²⁷¹, de acuerdo con datos recientes, podría esperarse que los niveles circulantes de S1P unido a HDL aumentaran concomitantemente ²⁷². De acuerdo con este concepto, las estrategias experimentales diseñadas para neutralizar la S1P unida a HDL hacen que la HDL sea menos funcional ^{267, 272-275}. En un contexto diabético, las HDL con un contenido elevado de S1P confieren protección a las células endoteliales a través de los receptores de S1P (S1PR) S1PR1/3 ²⁷⁶.

Varias líneas de estudio también respaldan el papel de la S1P unida a HDL y/o la ApoM en la prevención de la IC. Así, el contenido de S1P de HDL también evita que los cardiomiocitos ventriculares desarrollen apoptosis inducida ²⁷⁷, lo que sugiere fuertemente un papel para la circulación de S1P unida a HDL en la limitación de la muerte de cardiomiocitos. Tanto la ApoM unida a HDL como la S1P, atenúan la muerte de las células

endoteliales al bloquear la apoptosis de manera cooperativa actuando a través de S1PR1 y S1PR3 endoteliales ²⁷⁸.

2. *Implicaciones clínicas del metabolismo de esfingolípidos en la patogenia de la cardiomiopatía*

A excepción de los tratamientos convencionales no específicos dirigidos a lograr un control glucémico intensificado, no existe un tratamiento efectivo o definido para esta condición. Aunque la base fisiopatológica que subyace a las alteraciones funcionales y estructurales en el corazón diabético aún no está bien definida, las hipótesis actuales incluyen lipotoxicidad y fibrosis cardíacas, y una utilización defectuosa de sustratos por parte de los cardiomiocitos, posiblemente atribuida a una alteración de la señalización de la insulina ²⁷⁹⁻²⁸¹.

3. *Las ceramidas como diana terapéutica*

Las estrategias dirigidas a reducir la síntesis de ceramidas incluyen la reducción de la captación de ácidos grasos por el miocardio y la conversión de los ácidos grasos a especies no lipotóxicas como los triglicéridos. Diferentes estudios de intervención dirigidos a reducir las concentraciones circulantes de ácidos grasos mejoran la función cardíaca, a través de una reducción de la lipotoxicidad en ese tejido como consecuencia de la disminución en el contenido de ceramidas. Entre los estudios de intervención realizados constan la administración de troglitazona (un agonista de PPAR γ) en ratas ZDF, tratamiento con insulina en ratones AkitaIns2 (WT/C96Y), y la sobreexpresión de diacilglicerol aciltransferasa en ratones MHC-ACS1 ^{90, 98, 243, 259}.

4. Efectos cardiovasculares de FTY720/Fingolimod: un análogo estructural de la S1P

FTY720/Fingolimod es un inmunomodulador utilizado principalmente para el tratamiento de la esclerosis múltiple que fue aprobado por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) en 2010 ¹⁵⁷ (Figura 5). Es un análogo estructural de S1P y se fosforila *in vivo* a través de la acción de la SphK2 ¹⁵⁷. Cabe destacar que los sujetos con esclerosis múltiple presentan una mayor tasa de mortalidad en comparación con la población general, y el exceso de mortalidad puede explicarse, al menos en parte, por la aparición de enfermedades cardiovasculares ²⁸².

Es probable que los mecanismos etiopatogénicos y las características patológicas relacionadas con las manifestaciones cardíacas en sujetos con esclerosis múltiple, sean completamente diferentes a los de la CMD. Tampoco se ha reportado si la administración de FTY720/Fingolimod puede proteger contra el daño cardíaco en sujetos humanos con esclerosis múltiple. Estudios previos muestran que su administración puede proteger contra el desarrollo de arteriosclerosis ²⁸³⁻²⁸⁵ y el daño de la microvasculatura inducido por la DM ²⁸⁶ en modelos experimentales. Consistentemente, la administración de FTY720/Fingolimod influye favorablemente en las causas isquémicas de IC también en modelos experimentales ^{287, 288}. Sin embargo, la contribución positiva de FTY720/Fingolimod en enfermedades cardíacas no vasculares y no isquémicas, como la CMD, no se ha estudiado aún.

En particular, los datos recientes respaldan una acción favorable de la administración de FTY720/Fingolimod para mejorar la cardiomiopatía hipertrófica *in vivo* ²⁸⁹ al mejorar la disfunción diastólica y revertir parcialmente la remodelación auricular en un modelo genético de ratón de miocardiopatía hipertrófica. En este estudio los efectos favorables por parte de este fármaco contra el desarrollo de esta cardiomiopatía se

relacionaron con una mejora del estrés oxidativo que se acompañó de una reducción en la abundancia relativa del receptor S1PR1 cardíaco; sin embargo, en dicho trabajo no se vincularon mecanísticamente ambos procesos. Tampoco se determinaron las ceramidas en miocardio, pero siendo FTY720/Fingolimod un derivado de la miriocina, inhibidor específico de la SPT, podría postularse también que al menos en parte su efecto favorable pudiera deberse a una disminución en la síntesis de ceramidas miocárdicas en ratones tratados.

Nuestros datos preliminares mostraron por primera vez un efecto favorable de FTY720/Fingolimod en la CMD experimental *in vivo* empleando ratones db/db⁴⁰, previniendo la disfunción diastólica. En general, nuestras observaciones, junto con las de un estudio anterior²⁸⁹, respaldarían la hipótesis de que la modificación de la señalización de los esfingolípidos puede ser un enfoque terapéutico novedoso en el tratamiento de la CMD.

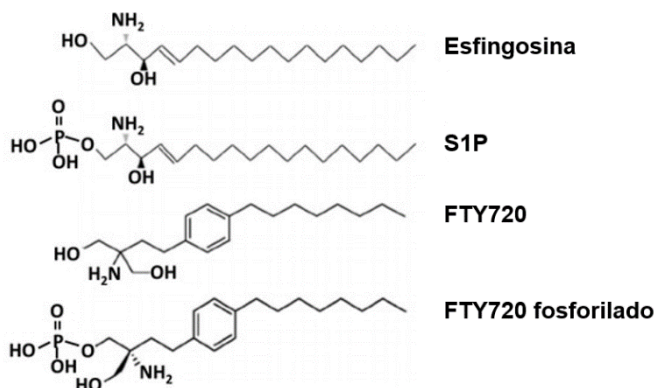


Figura 5. Analogías estructurales entre FTY720/Fingolimod y S1P

Se muestran las estructuras moleculares de la esfingosina, S1P, FTY720/Fingolimod, y la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Parte 1. Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD

Hipótesis

Aunque las causas fisiopatológicas de la CMD todavía no se conocen con exactitud ²⁹⁰, diferentes evidencias recientes respaldan la noción de que una señalización alterada de la insulina como base de su manifestación y progresión a etapas más avanzadas, conduciendo en última instancia a la IC. **En una primera fase del estudio se hipotetizó que la CMD será detectable en modelos experimentales de prediabetes (modelo de obesidad inducida con dieta rica en grasas e insulinoresistencia) y de DM2 (modelo db/db).**

Las ceramidas y sus metabolitos intermediarios se han relacionado con el desarrollo de CMD en modelos animales de diabetes y obesidad ¹⁵⁶. Sus niveles circulantes vienen principalmente determinados por su síntesis en hígado. Dado que los esfingolípidos regulan múltiples procesos celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis ²⁹¹, podrían contribuir en el remodelado y disfunción miocárdica observado en sujetos con DM. **Por ello, se propuso testar la hipótesis de que las ceramidas circulantes se relacionan con CMD en modelos experimentales de prediabetes y de DM2.**

Por otro lado, la concentración de LDL modificadas y, en particular de una pequeña fracción de éstas, las LDLox, se encuentra frecuentemente aumentada en sujetos diabéticos. Las LDLs modificadas presentan un alto poder citotóxico a través de la inducción de estrés oxidativo, inflamatorio y son altamente proapoptóticas, todos ellos mecanismos frecuentemente relacionados con el remodelado y disfunción cardíaca. **Por tanto, se testó**

la hipótesis de que las LDLox exacerbaban la apoptosis, uno de los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de CMD.

Objetivos

1. Analizar las alteraciones metabólicas en un modelo experimental de prediabetes (= obesidad e insulinoresistencia en ratones db/+ alimentados con una dieta rica en grasas con un fondo genético C57BLKs/J), y en un modelo de DM2 (ratones db/db y db/db catabólicos con el mismo fondo genético). Para ello, se evaluarán los parámetros corporales y bioquímicos séricos, así como los de remodelado, funcionalidad y bioquímica cardíaca.
2. Identificar y cuantificar varias especies de lípidos, incluyendo los esfingolípidos (principalmente ceramidas), en plasma total, en subfracciones lipoproteicas y en tejidos diana (hígado y miocardio) en modelos animales de prediabetes y DM2.
3. Explorar la contribución de las LDLox a la CMD, utilizando una línea primaria de cardiomiocitos humanos (AC16), estudiando la acumulación de lípidos y la apoptosis en condiciones de cultivo celular que mimetizan la DM2 (i.e., niveles elevados de glucosa y ácido palmítico).
4. Evaluar la cinética metabólica de LDLox en sangre y en tejidos diana, incluyendo el cardíaco. En cardiomiocitos AC16 se determinará la vía de entrada de estas mediante inhibidores específicos de receptores de lipoproteínas.

Parte 2. Uso de un análogo estructural de la S1P (FTY720/Fingolimod) para el tratamiento de la CMD

Hipótesis

A excepción de un control glucémico intensificado, no existe un tratamiento efectivo para la CMD. FTY720/Fingolimod es un análogo estructural de la esfingosina. Su forma fosforilada (activa), es un análogo estructural de la S1P, un esfingolípido bioactivo al que se le atribuye un papel ateroprotector en modelos experimentales²⁸³⁻²⁸⁵ y que también protege a los cardiomiocitos contra el daño inducido por de hipoxia. Las acciones favorables atribuidas a S1P parecen depender viene principalmente determinadas por su unión a receptores específicos tales como S1PR1 y S1PR3²⁹² y la consiguiente señalización que inducen¹⁵⁷. Sin embargo, aún no se ha estudiado la contribución de FTY720/Fingolimod en la CMD. **En este trabajo se ha testado la hipótesis de que FTY720/Fingolimod previene el remodelado y la disfunción miocárdica establecida en ratones db/db, a través de mecanismos antiinflamatorios y antiapoptóticos.**

Objetivos

1. Evaluar la estructura y funcionalidad cardíaca en modelos animales de DM2 (ratones db/db y db/db catabólicos) tras el tratamiento con FTY720/Fingolimod.
2. Al final del tratamiento se determinarán:
 - 2.1) los parámetros corporales y bioquímicos séricos, y niveles circulantes de adiponectina y citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.
 - 2.2) los cambios en la expresión/abundancia relativa de dianas moleculares involucradas en la fosforilación y señalización de

FTY720/Fingolimod, disfunción cardíaca, inflamación, apoptosis, estrés de RE, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en miocardio.

3. Evaluar el efecto de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación y apoptosis en cardiomiocitos AC16 en cultivos expuestos a condiciones diabéticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales y dietas

En este trabajo, se utilizaron varios diseños experimentales para desarrollar los objetivos propuestos. En primer lugar, se realizó el seguimiento de los modelos animales de prediabetes (obesidad e insulinoresistencia) y DM2 para el estudio de la CMD. Se determinaron los parámetros corporales y los bioquímicos plasmáticos de interés, incluyendo los niveles de lípidos y esfingolípidos totales y subfracciones lipoproteicas. Así como el análisis de la funcionalidad cardíaca. En una segunda fase, se evaluó el efecto del agente terapéutico FTY720/Fingolimod, en el modelo DM2 sobre el peso corporal, la funcionalidad cardíaca, la acumulación de lípidos corporales en circulación y tejidos diana, así como marcadores de inflamación, apoptosis, estrés de retículo endoplasmático, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

En el bloque experimental del modelo de resistencia a la insulina (prediabetes), se utilizaron ratones a los que se les indujo obesidad y resistencia a la insulina, alimentándolos con una dieta rica en grasas.

En el caso del modelo de DM2, se trabajó con ratones db/db en un fondo genético C57BLKs/J, que son un modelo genético comercial de diabetes, con una mutación espontánea en el gen de la leptina (Jackson Lab, Cat. N° 00642; <https://www.jax.org/strain/000642>). Los ratones db/db utilizados en el estudio se generaron a partir de parejas de ratones heterocigotos, db/+, de acuerdo con las instrucciones de selección de descendencia descrito en el enlace antes indicado. En nuestro estudio se seleccionaron los ratones macho.

Todos los procedimientos animales se revisaron y aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado Animal y el Comité Ético del *“Institut de Recerca*

de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau" (Núm. Autorización 10.454), y los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las guías establecidas.

3.1.1 Métodos y procedimientos compartidos en los diferentes diseños experimentales

Los animales se distribuyeron en los diferentes grupos en función de sus características genéticas y fenotípicas antes de empezar los estudios. En nuestro caso, al depender de la tasa de cría y del uso de ratones macho para propósitos experimentales, algunos de los diseños experimentales se repitieron las veces necesarias hasta alcanzar el número mínimo de animales por grupo a efectos estadísticos para completar los análisis programados.

Los animales tuvieron libre acceso al consumo de alimento y agua en todo momento. Tras la adquisición de los animales reproductores (F0) estos se repartieron en jaulas de reproducción a partir de los 7 días de su recepción para asegurarnos de una buena aclimatación a las condiciones de estabulación. Su descendencia se utilizó para los diferentes procedimientos. En la evaluación del efecto de FTY720/Fingolimod, este se administró oralmente en el agua de bebida y la dosis se escogió de acuerdo con una publicación previa reciente ³³⁵.

Todos los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura (20°C) y humedad (66%) controladas, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (h). El peso corporal, el consumo de agua y comida fueron monitorizados semanalmente durante el período de estudio. En algunos grupos también, se realizaron pruebas funcionales del metabolismo de la glucosa y la insulina.

Los datos bioquímicos, pruebas funcionales, la evaluación de la funcionalidad cardíaca, la expresión génica y la abundancia relativa de proteínas de dianas moleculares se realizaron con el fenotipo establecido,

al final del tratamiento, siendo establecido en 7 meses de vida (modelo de prediabetes) o 4 meses (modelo DM2) según correspondiera. Para ello, los animales se mantuvieron en ayuno durante 4 h, fueron eutanasiados posterior ecocardiografía y exsanguinados por punción intracardiaca, previa anestesia con vapores de isoflurano (Forane®, Abbott). La sangre se recolectó y el plasma o suero se obtuvieron mediante centrifugación a 3.000 g a 4°C durante 10 min. El consumo de agua y comida reportado en las tablas de resultados se monitorizó durante los 2 días previos a la eutanasia. En este caso, los animales se individualizaron en jaulas y fueron aclimatados durante 24 h.

3.1.2 Modelo de prediabetes (obesidad e insulinoresistencia)

Se emplearon ratones db/+ macho de 2 meses de vida, con el fondo genético C57BLKs/J y fueron separados en 2 grupos experimentales de n=10 cada uno (Figura 6). Para generar los ratones obesos con resistencia a la insulina, uno de los grupos fue alimentado con una dieta rica en grasas TD 07011 (Envigo, Tabla 4) durante 5 meses consecutivos.

Los ratones control se alimentaron por el mismo período de tiempo con dieta de mantenimiento hipocalórica (Teklad 2014, Tabla 4). Al finalizar el período de seguimiento, se procedió a la evaluación de la funcionalidad cardíaca, eutanasia de los animales y la recolección de las muestras de interés para la determinación de los parámetros bioquímicos, la expresión génica y abundancia relativa de proteínas de dianas moleculares.

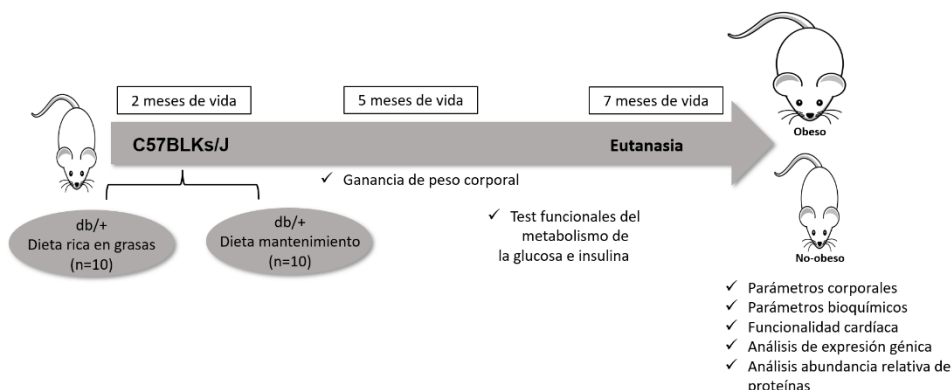


Figura 6. Evaluación del desarrollo de CMD en un modelo de prediabetes (obesidad e insulinresistencia)

Se realizó el estudio de los diferentes parámetros corporales, bioquímicos, así como la evaluación del impacto del fenotipo en diferentes pruebas funcionales en ratones C57BLKs/J alimentados con dieta rica en grasas, versus controles delgados alimentados con dieta de mantenimiento. La evaluación de la funcionalidad cardíaca, los análisis de parámetros corporales, bioquímicos, la expresión génica y abundancia de proteínas se realizaron a los 7 meses de edad. Se llevaron a cabo pruebas funcionales relacionadas con el metabolismo de la glucosa aproximadamente 1 mes antes de la eutanasia (n=10 por grupo).

3.1.3 Modelo de DM2

Se utilizaron ratones machos y hembras db/+, con fondo genético C57BLKs/J para la generación de una colonia estable y la obtención de los ratones db/db. Se seleccionaron los ratones macho (n=20) a los 2 meses de vida para los estudios previstos, y el seguimiento se realizó durante 2 meses.

Una pequeña fracción de los ratones db/db generados evolucionó hacia una diabetes más exacerbada, lo que resultó en una reducción del peso corporal a pesar de no registrarse cambios en la ingesta, y que denominamos catabólica (db/db_{cat}) en analogía a la que suele encontrarse en ratones hechos diabéticos mediante la administración de STZ o aloxano. La reducción de peso corporal se relacionó con una disminución

de grasa corporal en diferentes regiones y se acompañó de una reducción en los niveles séricos de insulina.

Este viraje fenotípico no se ha reportado previamente, pero dio lugar a un subgrupo de características diferentes (n=7) a los ratones db/db con características estándares. Este cambio se manifestó aproximadamente a partir del tercer mes de vida en los denominados db/db_{cat}. A los que seguían normalmente el curso de ganancia de peso corporal optamos por nombrarlos como db/db metabólicos (db/db) y de esta manera diferenciar ambos grupos experimentales de ratones db/db. El grupo control consistió en ratones delgados, db/+ (n=6) con el mismo fondo genético (C57BLKs/J). Todos los animales fueron alimentados con dieta de mantenimiento (Teklad 2014).

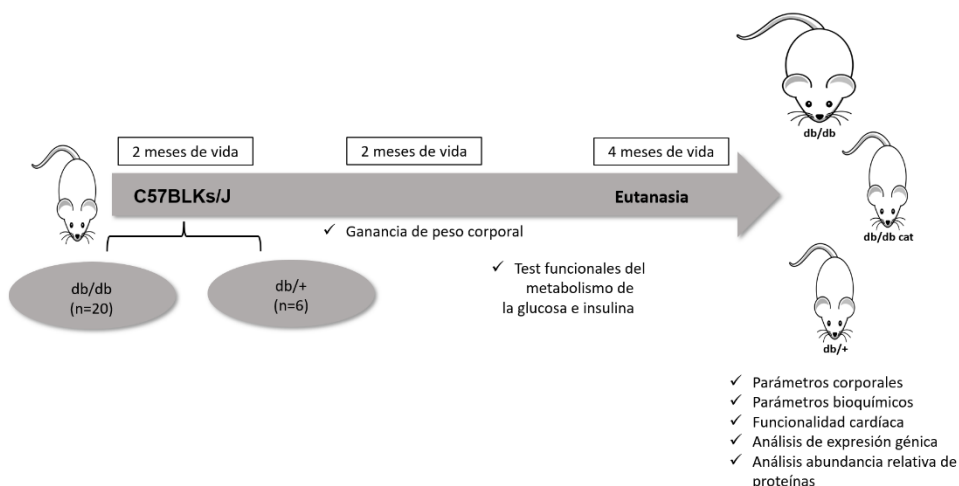


Figura 7. Evaluación del desarrollo de CMD en un modelo de DM2

Se llevó a cabo el estudio de los diferentes parámetros corporales, bioquímicos, así como la evaluación del impacto del fenotipo en diferentes pruebas funcionales en ratones db/db con fondo genético C57BLKs/J, versus controles delgados db/+ (con el mismo fondo genético), alimentados con dieta de mantenimiento. Al final del seguimiento se obtuvo un subgrupo de animales db/db denominados catabólicos (db/db cat) por la pérdida o falta de ganancia de peso corporal al igual que sus congéneres db/db. La evaluación de la funcionalidad cardíaca, los análisis de parámetros corporales, bioquímicos, la expresión génica y abundancia de proteínas se realizaron a los 4 meses de edad. Se llevaron a cabo pruebas funcionales relacionadas con el metabolismo de la glucosa aproximadamente 1 mes antes de la eutanasia (n=6-10 por grupo).

Al finalizar el período de seguimiento, a los 4 meses de vida, se procedió a la evaluación de la funcionalidad cardíaca, eutanasia y obtención de las muestras de interés para la determinación de los parámetros bioquímicos, la expresión génica y abundancia relativa de proteínas de dianas moleculares (Figura 7).

3.1.3.1 Evaluación del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD

Tras la evaluación de la funcionalidad cardíaca de ambos modelos animales, prediabetes (ratones obesos inducidos con la dieta rica en grasas) y DM2, se determinó que el modelo DM2 desarrolló signos de CMD, por lo cual para la segunda etapa del estudio se procedió a trabajar sólo en este modelo animal. Se emplearon una nueva tanda de ratones machos y hembras db/+ (fondo genético C57BLKs/J) a fin de generar la colonia de ratones machos diabéticos db/db e incluirlos en el tratamiento con el fármaco.

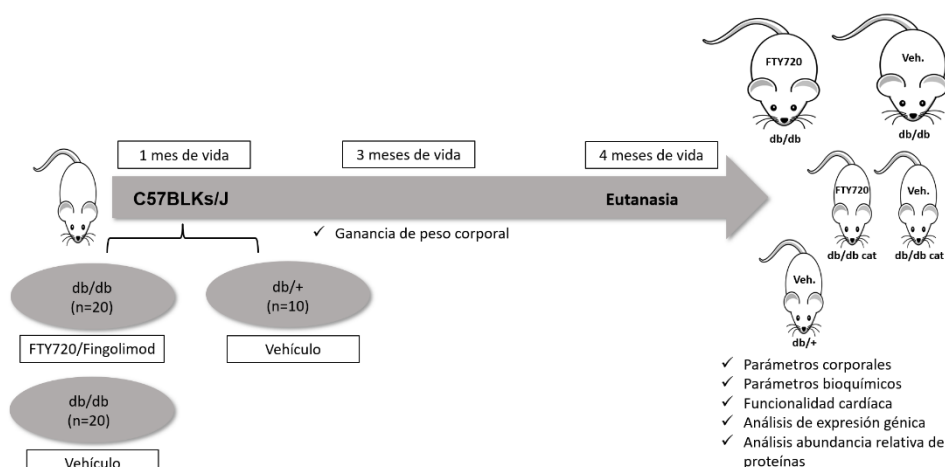


Figura 8. Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD en los fenotipos de DM2

Se evaluó el efecto del FTY720/Fingolimod sobre diferentes parámetros corporales, bioquímicos, de funcionalidad cardíaca e inmunohistoquímicas de miocardio en ambos fenotipos de DM2; db/db y catabólica (db/db cat), en ratones db/db con fondo genético C57BLKs/J versus controles delgados db/+ (con el mismo fondo genético) después de 3 meses de tratamiento. Se utilizaron 4 grupos de ratones db/db (n=5-10 cada uno), 2 de los cuales fueron sometidos a la administración del fármaco vía oral disuelto en el agua de

bebida y los otros 2 grupos recibieron el vehículo (agua). El grupo db/+ recibió el vehículo. Abreviatura: Veh, vehículo.

En la evaluación del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD se utilizaron ratones macho db/db (n=20) de 1 mes de vida distribuidos en 2 grupos (FTY720/Fingolimod y vehículo) y el período de administración del fármaco y del vehículo fue de 3 meses vía oral, hasta alcanzar los 4 meses de vida (

Figura 8). Se utilizó una solución madre de FTY720/Fingolimod (Cat. N° CAY-10006292. 250 MG, Cayman Chemicals), disuelta en agua. Conforme el seguimiento avanzó, se separaron en grupos experimentales diferentes los animales que mostraron características fenotípicas de diabetes catabólica (db/db_{cat}) de los db/db. Incluimos un grupo de ratones db/+ (n=10) que bebió el vehículo del agente terapéutico (agua) durante el mismo período de seguimiento.

Al finalizar el período de seguimiento, se procedió a la evaluación de la funcionalidad cardíaca, eutanasia de los animales y la recolección de las muestras de interés para la determinación de los parámetros bioquímicos, la expresión génica y abundancia relativa de proteínas de dianas moleculares.

3.1.4 Dietas empleadas en el estudio

Las composiciones de las diferentes dietas utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 4.

Parámetros	Dieta de mantenimiento (Teklad 2014)	Dieta rica en grasas (Envigo 07011)
Proteína (%)	20,0	21,0
Carbohidrato (%)	67,0	24,6
Grasa (%)	13,0	55,0
Densidad de energía (Kcal/g)	2,9	4,8

Tabla 4. Información nutricional de las dietas empleadas en el estudio de los modelos animales de prediabetes (obesidad inducida con dieta rica en grasas) y DM2

Los principales componentes brutos de la dieta se muestran como porcentaje, expresado en peso de la dieta.

3.2 Análisis bioquímico

3.2.1 Análisis de la bioquímica plasmática

La bioquímica plasmática se efectuó por procedimientos automatizados o manuales, según el caso. Los parámetros de rutina fueron analizados utilizando *kits* comerciales adaptados al autoanalizador. La insulina fue analizada por *kits* ELISA, mientras que los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias y adiponectina se midieron a través de la técnica Luminex.

3.2.1.1 Análisis automatizado de la bioquímica plasmática

La sangre se extrajo por punción intracardíaca de los ratones previamente anestesiados con isoflurano. Después de la recolección, la sangre se centrifugó inmediatamente a 3.000 g y 4°C; el sobrenadante se recolectó y almacenó a -80°C hasta su análisis.

La mayoría de los compuestos químicos del plasma, como la glucosa (Cat. N° 4404483190); colesterol (Cat. N° 3039773190); triglicéridos (Cat. N° 20767107322); creatinina (Cat. N° 04810716190); alanina aminotransferasa (ALT, Cat. N° 20764949322) y aspartato aminotransferasa (AST, Cat. N° 20764949322), y BUN (del inglés, *Blood Urea Nitrogen*, UREAL, Cat. N° 4460715190) se determinaron utilizando *kits* comerciales adaptados al autoanalizador COBAS c501/6000 (Roche Diagnostics, Madrid, España). El colesterol libre (Cat. N° 435-35801), fosfolípidos (Cat. N° 296-63801) y ácidos grasos libres (AGL, NEFA-HR1: Cat. N° 434-91795; NEFA-HR2: Cat. N° 436-91995) se midieron usando reactivos de Wako Diagnostics. Las determinaciones de triglicéridos se

corrigen por el glicerol libre presente en el plasma (Cat. N° F6428-40ML; Sigma-Aldrich St. Louis, MO).

El control de calidad para cada uno de estos ensayos se realizó en tiempo de ejecución, los cuales se encontraron dentro del rango aceptable, definido como 2 veces la desviación estándar. *Precicontrol clin chem Multi 1* (Cat. N° 5117208922, Roche Diagnostics) y *Precicontrol clin chem Multi 2* (Cat. N° 5117291922, Roche Diagnostics) y el control de Wako Chemicals (Cat. N° 410-00102).

El coeficiente de variación calculado para cada ensayo fue <10%. El colesterol HDL se midió en plasma empobrecido en apolipoproteína B (ApoB), obtenido después de la precipitación con ácido fosfotúngstico e iones de magnesio (Roche Diagnostics).

3.2.1.2 Análisis de insulina en plasma por técnicas ELISA

La concentración plasmática de insulina se determinó utilizando el *kit* Ultra-Sensible de Insulina de Ratón (Cat. N° 90080, Crystal Chem Inc., Downers Grove IL, USA), que está basado en el inmunoensayo enzimático tipo *sandwich*. La preparación de los reactivos del ensayo, los estándares y los controles de calidad se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.2.1.3 Determinación de citoquinas y adiponectina en plasma mediante un enfoque multiplex

Este análisis se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Mercedes Camacho en el “*Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*”.

Se utilizó un *kit* de microesferas magnéticas *Milliplex Map Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead* (MCYTOMAG-70K; Merck-Millipore),

diseñando un *kit* personalizado de 5 complejos que contenían las citoquinas específicas, incluyendo IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF α e IL-10. Esta metodología también se aplicó para la determinación de las concentraciones plasmáticas de adiponectina (MADCYMAG-72K; Merck-Millipore). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cuentas magnéticas se leyeron en un instrumento de detección basado en flujo de doble láser, como el Luminex® 100™, Luminex 200™.

3.2.2 Determinación de niveles de FTY720/Fingolimod y su forma fosforilada en plasma y miocardio de ratones db/db mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Esta determinación se realizó a través de *Eurecat*, centro de ciencias ómicas de la “*Universitat Rovira i Virgili*”.

Las muestras de plasma (20 μ L) se mezclaron con 25 μ L de estándares internos (FTY720-d4 a 20 ng/mL y FTY720-P-d4 a 200 ng/mL) y 200 μ L de metanol. En cambio, las muestras de miocardio (aproximadamente 15 mg) se mezclaron con 25 μ L de estándares internos (FTY720-d4 a 20 ng/mL y FTY720-P-d4 a 200 ng/mL) y 500 μ L de metanol. Las muestras se sonicaron en un procesador de líquidos Vibra-Cell Ultrasonic durante 30 segundos (ampl. 40%). Todas las muestras, tanto de plasma como miocardio, se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 min a 4°C y 15.000 rpm. Los sobrenadantes se evaporaron a 45°C, se reconstituyeron en 50 μ L de metanol y se transfirieron a viales de vidrio para el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

La separación cromatográfica se realizó en gradiente. La fase móvil A fue agua con 0,1% de ácido fórmico y la B fue acetonitrilo:isopropanol (1:1, v:v) con 0,1% de ácido fórmico²⁹³. La temperatura de la columna se fijó en 40°C y el volumen de inyección fue de 5 μ L.

3.2.3 Aislamiento de lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial

El aislamiento de las diferentes lipoproteínas plasmáticas se realizó por ultracentrifugación secuencial según el método descrito por Havel y colaboradores³⁴⁵. El método está basado en el hecho de que es posible aislar todas las lipoproteínas por flotación a una densidad inferior a la de cada tipo de lipoproteínas (lipoproteínas de muy baja densidad, es decir, VLDL a $d < 1,006$ g/mL; lipoproteína de baja densidad, es decir, LDL entre $1,019 < d < 1,063$ g/mL; y lipoproteínas de alta densidad, es decir, HDL entre $1,063 < d < 1,210$ g/mL). La densidad del plasma/suero es de 1,006 g/mL. La densidad del plasma/suero es de 1,006 g/mL. Las densidades plasmáticas finales se ajustaron utilizando la fórmula de Radding y Steinberg²⁹⁵ (Figura 9).

$$X = \frac{V*(df-di)}{1-(0,312*df)}$$

Figura 9. Fórmula de Radding y Steinberg

Donde X=g de bromuro de potasio (KBr); V=volumen de plasma en mL, df=densidad final en g/mL, di=densidad inicial en g/mL, y 0,312=volumen específico parcial de KBr.

El fraccionamiento secuencial de las diferentes fracciones de lipoproteínas plasmáticas por ultracentrifugación, se realizó tras ajustar la densidad plasmática inicial a la densidad final deseada, para cada una de las especies de lipoproteínas plasmáticas. El cálculo de la cantidad de KBr necesaria para ajustar la densidad del plasma se realizó mediante la fórmula descrita (Figura 9). El volumen final se ajustó a la capacidad máxima proporcionada por el tubo de clase *ELIP* (2,5 mL) para muestras de ratones o el tubo de preparación en el caso de las muestras humanas, a 20 mL.

El plasma de los ratones carece de una fracción definida de LDL y el colesterol circulante se transporta principalmente en HDL. Tal es así que las HDL se consideran la principal fracción de lipoproteínas circulantes en el plasma de estos animales. Por lo tanto, en este trabajo se utilizó el rango de densidad $<1,063$ g/mL para aislar la fracción no-HDL, que incluye las lipoproteínas ricas en triglicéridos junto con la de la fracción de LDL, mientras que la fracción HDL se obtuvo del plasma sin lipoproteínas no-HDL.

Las fracciones de lipoproteínas plasmáticas de nuestros ratones se obtuvieron de una mezcla de plasma de $n=5$ de los diferentes grupos experimentales. La fracción de LDL humanas (LDL entre $1,019 < d < 1,063$ g/mL) se obtuvo de una mezcla de sueros de voluntarios normolipidémicos y se aisló por ultracentrifugación secuencial a 100.000 g durante 24 h en un rotor analítico de ángulo fijo (50.3, Beckman Coulter). La obtención y el uso de muestras de suero humano para este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética del “*Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*” de Barcelona.

En este trabajo se aisló la fracción no-HDL del plasma de ratón para emplearlas en los estudios de lipidómica. Mientras que la fracción LDL humana, se utilizó en los estudios *in vivo* de cinética de captación lipoproteínas, marcadas con un fluorocromo, para evaluar la captación diferencial de lipoproteínas en el modelo animal de DM2. Así también en estudios *in vitro* en cardiomiocitos AC16, para la evaluación de la captación de lipoproteínas modificadas por diferentes receptores.

3.2.3.1 Aislamiento de la fracción de lipoproteínas no-HDL y HDL de ratón

Se empleó la fórmula de *Radding & Steinberg* para ajustar el volumen inicial de plasma de ratón ($d_i=1,006$ g/mL) a una densidad final de $1,063$ g/mL para obtener la fracción no-HDL.

El volumen inicial del plasma de partida de las diferentes muestras de ratones usualmente fue de entre 0,5-1 mL. Este volumen se estableció para garantizar que la suma de los volúmenes del plasma y la solución de densidad no sobrepase el volumen máximo de trabajo, determinado por la capacidad del tubo *ELIP* que es de 2,5 mL.

Así, el tubo *ELIP* contuvo el volumen inicial de plasma, el volumen calculado de solución concentrada de densidad 1,340 g/mL y la solución de densidad inicial hasta un volumen final de 2,5 mL. Se separó esta fracción no-HDL del sobrenadante, tras 18 h de ultracentrifugación a 100.000 g a 4°C.

El volumen restante de plasma es lo que se denomina plasma libre de no-HDL ($d_i=1,063$ g/mL) y esta se ajustó a la densidad final de 1,210 g/mL para aislar la fracción de HDL. La cual se obtuvo del sobrenadante luego de 24 h de ultracentrifugación a 100.000 g a 4°C.

3.2.3.2 Aislamiento de la fracción de LDL humana

En este caso, el volumen inicial de suero osciló entre 50 y 200 mL. Se utilizaron tubos de preparación de policarbonato. El suero se distribuyó en tantos tubos como fuera necesario para garantizar que la suma del suero en cada tubo y de la solución de densidad añadida no superara el volumen máximo de trabajo, determinado por la capacidad de este tipo de tubos de centrifuga, es decir, 20 mL.

Se utilizó la fórmula de *Radding & Steinberg* para ajustar el volumen inicial de suero ($d_i=1,006$ g/mL) a una densidad final de 1,019 g/mL para eliminar primeramente las lipoproteínas ricas en triglicéridos (es decir, VLDL, y las lipoproteínas de densidad intermedia, abreviadas como IDL y también definidas como restos de VLDL). Estas se aislaron del sobrenadante tras 18 h de ultracentrifugación a 100.000 g a 4°C.

Después de eliminar las lipoproteínas flotantes, se procedió a la preparación de las muestras para el aislamiento de la fracción de LDL. Primeramente, se reajustó el volumen del suero empobrecido en VLDL e IDL, al volumen inicial original con la solución de densidad 1,019 g/mL. Para el aislamiento de la fracción de LDL, se empleó la fórmula de *Radding & Steinberg* de tal manera a ajustar el volumen inicial de suero empobrecido en VLDL e IDL ($d_i=1,019$ g/mL) a una densidad final de 1,063 g/mL. La muestra se distribuyó en tantos tubos como fuera necesario para garantizar que la suma del suero en cada tubo sea de 20 mL. Se procedió a la ultracentrifugación durante 20 h a 100.000 g y temperatura de 4°C y se recogieron las LDL flotantes.

Las muestras de LDL recogidas se dializaron en membranas semipermeables en 2 L de tampón fosfato PBS pH=7,4 (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (1,37M NaCl; 0,027M KCl; 0,065M Na₂HPO₄·2H₂O y 0,015M KH₂PO₄) de forma a eliminar la sal añadida en el proceso de aislamiento. Para ello, se realizaron recambios del PBS cada 24 h durante las 72 h de diálisis. Finalmente, la muestra de LDL obtenida se recogió de la membrana de diálisis y se almacenó a 4°C hasta su uso.

3.2.3.3 Modificación de LDL humana

Se generó un tipo de LDL modificada a partir de las muestras de LDL humanas nativas (LDLnat) obtenidas previamente por ultracentrifugación secuencial, las LDL oxidadas (LDLox).

De la muestra de LDLnat aislada, se tomó una alícuota para la determinación de los niveles de ApoB y colesterol en el autoanalizador Cobas 501c/6000. Posteriormente, la muestra de LDLnat se diluyó con PBS hasta una concentración de ApoB igual a 0,25 g/L y se añadió la cantidad adecuada de sulfato de cobre a concentración final de 20 µM, se dejó actuando toda la noche. Al día siguiente se detuvo el proceso de

oxidación colocando la muestra en membrana de diálisis, en tampón A pH=7,4 (0,1 M Tris; 10 mM EDTA·K₂) con butilato de hidroxitolueno (BHT) a concentración final 20 µM, durante 24 h. La muestra obtenida de LDLox, se concentró mediante el uso de centricones de 50 K (Cat. N° UFC 805024, Merck Millipore).

3.2.3.3a Diálisis de las LDLox en medio de cultivo

Las LDLox, se sometieron a un proceso de diálisis en columnas de filtración PD10 (Cat. N° 28-9180-07, GE Healthcare), con medio de cultivo DMEM alto en glucosa (4,5 g/L) (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Cat. N° BE12-604F, Lonza) para los cardiomiocitos AC16 cultivados.

Se utilizaron 25 mL de medio de cultivo para equilibrar la columna. Se añadieron 2,5 mL de LDLox dejando que difundiera la muestra a través de la columna y finalmente se añadieron 3,5 mL de medio DMEM para eluir y recoger las muestras de LDLox. Estas lipoproteínas dializadas se filtraron en condiciones estériles con filtro de 0,22 µm para su uso posterior en los cultivos celulares.

3.2.3.4 Marcaje de LDL con fluorocromo perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil)

Mediante una modificación del método descrito previamente ²⁹⁶. Brevemente, se marcaron las lipoproteínas humanas tanto la fracción de LDLnat como las modificadas, LDLox. Se utilizó una solución madre de la sonda fluorescente Dil (Cat. N° D282, Invitrogen) que se preparó disolviendo 30 mg de Dil en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Cat. N° D8418-50ML, Sigma Aldrich) y esta última se añadió a la solución de LDL a marcar para obtener una proporción final de 300 µg de Dil por 1 mg de ApoB de LDL.

Después de incubar esta mezcla durante 18 h a 37°C, la LDL marcada se volvió a aislar mediante centrifugación en centricones 50K, eluyendo con PBS. Se dializó utilizando columnas PD10 contra PBS, de tal manera que nos aseguramos su purificación completa. Se esterilizó mediante filtración con filtro de 0,22 µm antes de incubar con las células y se almacenaron hasta su uso protegidas de la luz a 4°C.

Para los ensayos en los que se utilizaron las lipoproteínas marcadas con Dil, LDLnat-Dil y LDLox-Dil, previa a la exposición de los cultivos celulares o a la inyección de estas a los ratones, se midió la concentración de ApoB para trabajar con cantidades conocidas de estas lipoproteínas.

3.2.4.4a Extracción lipídica de lipoproteínas marcadas con fluorocromo Dil y determinación mediante fluorimetría

Se llevó a cabo la extracción de las LDL marcadas con Dil, LDLnat-Dil y LDLox-Dil, para su determinación mediante fluorimetría. Este proceso fue posterior a la incubación con los cardiomiocitos AC16, así como a la obtención de plasma y tejidos (miocardio, hígado, riñones) de los ratones sometidos a la prueba de captación diferencial de LDL.

Se añadió el tampón de lisis (NaOH 0,1 M + 1 g/L de SDS) a la placa de células, a los tubos de plasma o el triturado de los tejidos, se mantuvieron las muestras con agitación suave durante 30-60 min, a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Se recogieron las muestras luego de una centrifugación a 3.000 g por 10 min, en tubos protegidos de la luz.

Finalmente se realizó la medición de la marca del fluorocromo Dil utilizando un volumen de 50 µL de muestra, en placa negra de 96 pocillos, a una longitud de onda de excitación 520 nm (500 nm) y de emisión a 580 nm.

3.3 Pruebas funcionales

3.3.1 Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral

La prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) se realizó administrando vía intraperitoneal una inyección de glucosa (2 mg/g de masa corporal) tras un ayuno de 4 h según se ha reportado previamente³⁴⁸ con pequeñas modificaciones. Los niveles de glucosa en plasma se determinaron a diferentes intervalos de tiempo t=0 (niveles basales), 15, 60, 120 y 180 min. La glucosa en sangre se midió con el glucómetro *Accu-Chek* (Roche Diagnostics) utilizando sangre de la vena de la cola. El área bajo la curva de concentración se calculó por el método lineal trapezoidal, para comparar la tolerancia a la glucosa entre los grupos.

3.3.2 Prueba de tolerancia a la insulina

La prueba de sensibilidad a la insulina (PTI) se llevó a cabo administrando una inyección intraperitoneal de insulina (0,9 U/kg de masa corporal) después de un ayuno de 4 h se ha reportado previamente³⁴⁸ con pequeñas modificaciones. Los niveles de glucosa plasmática se determinaron en t=0 (niveles basales), 15, 60, 120 y 180 min. La glucosa en sangre se midió con el glucómetro utilizando sangre de la vena de la cola. El área bajo la curva se calculó por el método lineal trapezoidal para comparar entre los diferentes grupos de estudio.

3.3.3 Evaluación de la captación miocárdica de LDLox marcadas con fluorocromo (Dil)

Se emplearon ratones machos db/db de 4 meses de vida (n=10) distribuidos en 2 grupos experimentales, los que recibieron LDL humanas previamente marcadas con el fluorocromo Dil, LDLnat-Dil (n=5) versus LDLox-Dil (n=5).

Las lipoproteínas marcadas fueron administradas a los distintos grupos de ratones por vía de la vena de la cola. Se utilizaron como controles de la cinética de captación y eliminación, ratones no diabéticos (db/+) de la misma edad y que fueron sometidos a la inyección de las lipoproteínas tal como se menciona más arriba, distribuidos en 2 grupos experimentales de n=5 cada uno (Figura 10).

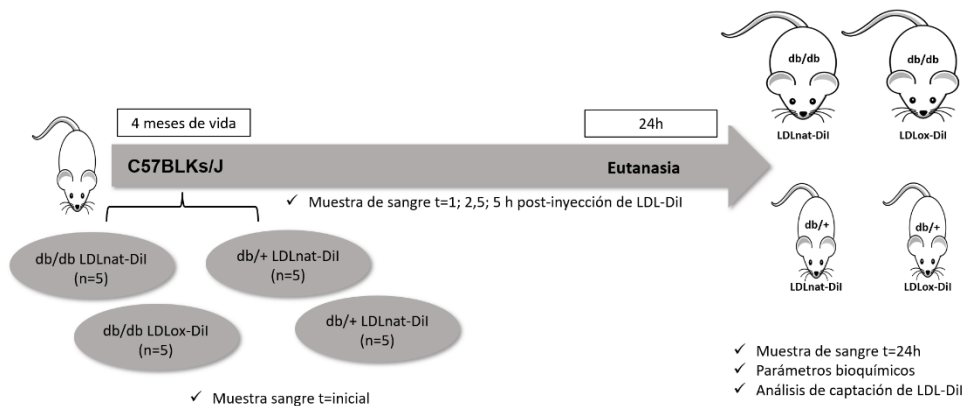


Figura 10. Evaluación de la captación miocárdica de LDLox-Dil en un modelo animal de DM2

Se realizó el estudio de parámetros bioquímicos y determinación de la fluorescencia del Dil en plasma y tejidos (miocardio, hígado y riñones) de los ratones db/db versus controles no diabéticos (db/+) tras ser inyectados con LDLnat-Dil o LDLox-Dil humanas. El estudio de la cinética de captación y eliminación de las lipoproteínas marcadas se realizó por un período de 24hs (n=5 por grupo).

Se recolectaron muestras de sangre, extraídas de la vena de la cola, a diferentes tiempos (inicio, 1; 2,5; 5 y 24 h) para la obtención de suero y posterior determinación de los niveles de fluorescencia del fluorocromo Dil.

Al finalizar el período de seguimiento de los ratones se procedió a la eutanasia y colección de las muestras de interés, en este caso corazón, riñones e hígado. Estas fueron recolectadas en suero fisiológico e inmediatamente disgregadas en tampón de lisis (NaOH 0,1 M + 1 g/L de SDS), para la medición de los niveles de fluorescencia del Dil en estos tejidos

3.3.4 Mediciones de la funcionalidad cardíaca mediante ecocardiografía (modo M y Doppler)

Los datos ecocardiográficos se registraron al final del seguimiento de los modelos animales de prediabetes (ratones con obesidad inducida por dieta rica en grasas) y DM2 (db/db y db/db_{cat}), respectivamente. Los ratones anestesiados (2% de isoflurano) fueron sometidos a ecocardiografía transtorácica utilizando una unidad de ultrasonido Vevo2100 con un transductor de 30 MHz (Visual Sonics, Toronto, ON, Canadá).

Se obtuvieron imágenes bidimensionales y en modo M en vistas paraesternal de eje largo y de eje corto, respectivamente, a partir de las cuales se obtuvieron las siguientes medidas del ventrículo izquierdo (VI): grosor del septo interventricular (IVS), dimensión interna del VI (LVID) y grosor de la pared posterior del VI (LVPW) y de la pared anterior del VI (LVAW) en diástole (d) y sístole (s) (IVSd, LVIDd, LVPWd, LVAWd y IVSs, LVIDs, LVPWs, LVAWs, respectivamente). La fracción de eyección (EF), la fracción de acortamiento (FS) y la masa del VI se determinaron automáticamente a partir de las mediciones del modo M realizadas por el *software* (Tabla 5).

Parámetro	Abreviatura	Significado
Grosor del septo interventricular	IVS	<i>Interventricular Septal Thickness</i>
Dimensión interna del ventrículo izquierdo	LVID	<i>Left Ventricle Internal Dimension</i>
Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo	LVPW	<i>Left Ventricle posterior wall</i>
Grosor de la pared anterior del ventrículo izquierdo	LVAW	<i>Left Ventricle anterior wall</i>
Fracción de eyección	EF	<i>Ejection fraction</i>
Fracción de acortamiento	FS	<i>Fractional shortening</i>
Tiempo de eyección de la válvula mitral	MV ET	<i>Mitral Valve Ejection Time</i>
Tiempo de eyección aórtica	AET	<i>Aortic Ejection Time</i>
Tiempo de contracción isovolumétrica	IVCT	<i>Isovolumetric Contraction Time</i>
Tiempo de relajación isovolumétrica	IVRT	<i>Isovolumetric Relaxation Time</i>

Tabla 5. Parámetros de funcionalidad cardíaca medidos en sístole y diástole mediante ecocardiografía transtorácica

Para lograr las determinaciones de la función diastólica, se obtuvieron videos e imágenes del corazón con visión 4 cámaras en el modo B y usando el PW (del inglés, *Power Doppler*) para cuantificar el flujo a través de la válvula mitral. La velocidad máxima de llenado temprano (E), la velocidad máxima auricular (A), la relación E/A, el tiempo de eyección de la válvula mitral (MV ET) o el intervalo entre el comienzo de la onda E hasta la línea base 0. También se determinaron el tiempo de eyección aórtica (AET) y el tiempo de contracción y relajación isovolumétricas (IVCT y IVRT, respectivamente).

3.4 Análisis del perfil de lípidos y esfingolípidos mediante Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas

3.4.1 Determinación del contenido lipídico en miocardio e hígado mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Estos análisis se realizaron en la plataforma de metabolómica del “*Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*”, Reus.

Los extractos lipofílicos se obtuvieron a partir de 25 mg (peso seco) de tejido hepático/cardíaco murino previamente liofilizado mediante el método BUME ²⁹⁸. Se realizaron tres ciclos de extracción para maximizar la extracción de lípidos. En el primer ciclo, se añadieron 500 µL de una mezcla de butanol:metanol (3:1, v:v), 500 µL de una mezcla de éter de di-isopropilo:acetato de etilo (3:1, v:v) y 500 µL de D₂O. En el segundo y tercer ciclo, sólo se añadieron 500 µL de una mezcla de di-isopropilo éter:acetato de etilo (3:1, v:v). Los extractos lipofílicos se recuperaron y se secaron completamente en Speedvac hasta la evaporación de los disolventes orgánicos y se congelaron a -80°C hasta el análisis de 1 H-RMN.

Los extractos lipídicos se reconstituyeron en una solución de CDCl₃:CD₃OD:D₂O (16:7:1, v:v:v) que contenía tetrametilsilano (TMS) como referencia de desplazamiento químico y se transfirieron a tubos de vidrio de RMN de 5 mm. Los espectros de RMN-1H se registraron a 286 K en un espectrómetro Bruker Avance III 600 que operaba a una frecuencia de protones de 600,20 MHz (14,1 T). Para los extractos lipofílicos se utilizó un pulso de 90° con secuencia de presaturación de agua (ZGPR).

La cuantificación de las señales lipídicas en los espectros de 1H-NMR se realizó con LipSpin ²⁹⁸, un software propio basado en Matlab. Las

asignaciones de resonancia se hicieron sobre la base de los valores de la literatura ²⁹⁹.

3.4.2 Determinación de los niveles de esfingolípidos circulantes en plasma, en las fracciones de colesterol HDL y no-HDL, en miocardio e hígado por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Estos análisis se llevaron a cabo en la plataforma de metabolómica del “*Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili*”, Reus.

La extracción de lípidos circulantes se realizó con una extracción bifásica de 50 µL de muestra de plasma con 220 µL de metanol frío. Posteriormente, se añadieron 440 µL de diclorometano seguido de 140 µL de agua. Después de agitar vigorosamente, las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 min para separar las fases, las muestras se centrifugaron 10 min a 14.500 rpm a 4°C. Se evaporaron 350 µL de la fase orgánica hasta sequedad bajo una corriente de gas N₂ y se reconstituyeron en 150 µL de metanol:tolueno (9:1, v:v) antes del análisis LC-MS.

Los 600 µL de extractos de hígado y miocardio analizados previamente por RMN y disueltos en CDCl₃:MeOD:D₂O (17:6:1, v:v:v) fueron evaporados a sequedad y reconstituidos en 150 µL de metanol:tolueno (9:1, v:v).

El análisis de lipidómica LC/MS no dirigido se llevó a cabo usando un sistema UHPLC (serie 1200, Agilent Technologies) acoplado a un G6490A ESI-QqQ MS (Agilent Technologies) operado en modo de ionización por electropulverización positiva. La separación cromatográfica de los metabolitos se realizó mediante una columna Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1×150 mm; 1,7 µm, Waters) y un gradiente de fase móvil consistente en formiato de amonio 10 mM en acetonitrilo: agua (60:40, v:v)

como fase móvil A, y formiato de amonio 10 mM en isopropanol:acetonitrilo (90:10, v:v) como fase móvil B. El gradiente cromatográfico fue el siguiente: de 0 a 2 min el porcentaje de B subió de 15% a 30%, de 2 a 2,5 min %B aumentó a 48%, hasta min 11% B siguió aumentando a 82%, hasta 11,5 % B aumentó a 99 % min, isocrático durante medio minuto a 99% B, de 12 a 12,1 min disminuyó rápidamente a 15% B y finalmente la columna se equilibró a 15% B hasta 15 min. El flujo del método fue de 0,4 mL/min. La temperatura de la columna fue de 65°C y el volumen de inyección fue de 10 µL de plasma y 5 µL de muestras de hígado y miocardio.

Los parámetros para la fuente de ESI fueron los siguientes: temperatura y flujo del gas de secado, 150°C y 11L min⁻¹, respectivamente; nebulizador, 10 PTIg; temperatura y flujo de gas envolvente, 400°C y 11 L min⁻¹, respectivamente; tensión capilar, 3500 V y 1000 V en modo positivo y negativo respectivamente, y fragmentador 380 V.

Las principales especies lipídicas (Ceramidas, diacilgliceroles, Glucoceramidas, esfingomielinas) que pueden estar presentes en las muestras biológicas fueron las determinadas en este estudio³⁰⁰⁻³⁰². Los diferentes lípidos se analizaron mediante el modo *Multiple Reaction Monitoring*.

3.5 Análisis de tejidos

3.5.1 Colección de los tejidos

Al final de cada seguimiento de los diferentes estudios, los ratones con 4 h de ayuno fueron eutanasiados con una sobredosis de isoflurano. Para el análisis del RNAm y de las proteínas se recogieron los tejidos, se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Para el análisis histológico, se fijaron los trozos de tejido, de aproximadamente 0,5 cm³, con formol para su posterior procesamiento en parafina.

3.5.2 Tinción inmunohistoquímica

Una vez fijados los tejidos estos fueron deshidratados, embebidos en parafina y seccionados por el Servicio de Inmunohistoquímica de nuestro instituto. Las secciones incrustadas en parafina (5-8 µm de grosor) posteriormente se utilizaron para el análisis de las proteínas de interés mediante tinción inmunohistoquímica. Se indican las diferentes tinciones en miocardio de los ratones, tratados y sin tratar con FTY720/Fingolimod, así como las condiciones de incubación de los anticuerpos.

Anticuerpo primario	Condiciones de incubación	Referencia
Caspasa 3 activada (Asp 175) (policlonal de conejo)	ph bajo 1:200 30 min incubación Linker de conejo	Cell signaling 9661
IL-10 (policlonal de conejo)	ph alto 1:200 35 min incubación Linker de conejo	Biossusa BS-0698R
NF-KB p65 (clon D14E12)	ph bajo 1:1000 30 min incubación Linker de conejo	Cell signaling mAb 8242
S1PR1 (clon 8B7.1)	ph bajo 1:300 30 min incubación Linker de conejo	Sigma-Aldrich MABC94
TNFα (policlonal de conejo)	ph bajo 1:200 30 min incubación Linker de conejo	Genetex GTX110520

Tabla 6. Condiciones de incubación de los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica de miocardio de los modelos animales de DM2

3.5.3 Análisis de la expresión génica y abundancia relativa de proteínas de dianas moleculares de interés

3.5.3a Análisis de la expresión génica

El RNA total se extrajo de bioPTIas de miocardio (aproximadamente 25 mg) utilizando el *RNeasy Plus Mini Kit* (Cat. N° 74034, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y de extractos celulares (aproximadamente de 1 millón de células) utilizando el reactivo Trizol® (Cat. N° 1203977, Invitrogen), según el protocolo del proveedor, y se purificó mediante columnas *EZ-10 DNAaway RNA Miniprep Kit* (Cat. N° BS88136, Bio Basic) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las concentraciones de RNA se determinaron con un bioanalizador NanoDrop2000 (Thermo Scientific). También se determinaron las integridades de las muestras de RNA total utilizando el mismo bioanalizador.

Control de calidad del RNA

Tras la purificación, la concentración de RNA se determinó midiendo la absorción UV en un espectrofotómetro Nano Drop ND-2000. La densidad óptica (DO) a 260 nm se utilizó para determinar la concentración de RNA en la solución, considerando que un A260 de 1,0 equivale a unos 40 g/mL de RNA. La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utilizó para evaluar la pureza del RNA. Una relación de ~2,0 se acepta generalmente como pura para el RNA. Si la relación es sensiblemente inferior, puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm o cerca de ellos. Aceptamos muestras con una relación $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$.

Transcripción inversa

Para medir la expresión de RNA por qPCR en tiempo real, primero se transcribió el RNA en forma inversa a DNA complementario (cDNA). La síntesis de cDNA se logra mediante la acción de la transcriptasa inversa,

una enzima capaz de crear un DNA de cadena simple a partir de una plantilla de RNA en presencia de cebadores. Se utilizaron cebadores oligo(dT)₂₃ (Cat. N° 04387, Sigma Aldrich) y una mezcla de dNTPs (del inglés, *Deoxynucleotide Triphosphates*) (Cat. N° D7295-5ML, Sigma Aldrich), transcriptasa inversa *M-MLV*, *RNAse H Minus* y *Point Mutant* (Cat. N° M3682, Promega).

Análisis cuantitativo de la qPCR en tiempo real

El análisis qPCR a tiempo real se realizó utilizando sondas comerciales TaqMan. Para medir los niveles de expresión de los genes, utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para amplificar los productos de cDNA transcritos inversamente a partir del RNA. Utilizamos un método de cuantificación relativa, en el que se utilizan genes de referencia internos para determinar las diferencias de pliegues en la expresión del gen objetivo. La referencia interna es un gen de mantenimiento, en nuestro estudio fue la *Gapdh* o *Actina β*, según el caso, porque determinamos previamente que su expresión es constante en las diferentes condiciones experimentales de este trabajo.

Los cDNAs fueron sometidos a la amplificación por qPCR en tiempo real utilizando la mezcla de *TaqMan gene expression assays* (Cat. N° 4331182, Applied Biosystems). Las condiciones de ciclado térmico incluyeron 10 minutos a 95°C antes del inicio de los ciclos de qPCR, que consistieron en 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 65°C durante 1 min. Se utilizaron sondas específicas de ratón (Applied Biosystems) (Tabla7) para analizar la expresión génica en miocardio. Los ensayos de qPCR en tiempo real se realizaron en un termociclador C1000 acoplado a un sistema en tiempo real CFX96 (Bio-Rad Laboratories SA, Life Science Group). Todos los análisis se realizaron por duplicado. Los niveles de expresión relativa del RNAm se calcularon mediante el método $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Proteína	Referencia
<i>Atf4</i>	Activating Transcription Factor 4	Mm00515325_g1
<i>Atf6</i>	Activating Transcription Factor 6	Mm295319_m1
<i>bAct</i>	Actin β	Mm00607939-s1
<i>Ccl2</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 2	Mm00441242_m1
<i>Cd36</i>	Cluster of Differentiation 36	Mm00432403_m1
<i>Cybb</i>	Cytochrome b-245, beta <i>polypeptide</i>	Mm01287743_m1
<i>Ddit3</i>	DNA Damage Inducible Transcript 3	Mm135937_g1
<i>Dnml1</i>	DNA Methyltransferase 1	Mm01342903_m1
<i>Ern1</i>	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1	Mm00470233_m1
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1
<i>Hspa5</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	Mm00517691_m1
<i>Il10</i>	Interleukin 10	Mm01288386_m1
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 β	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Interleukin 6	Mm00446190_m1
<i>Ldlr</i>	Low Density Lipoprotein Receptor	Mm00440169_m1
<i>Lrp1</i>	LDL Receptor Related Protein 1	Mm00464608_m1
<i>Mnf1</i>	Mitofusin 1	Mm00612599_m1
<i>Mfn2</i>	Mitofusin 2	Mm00500120_m1
<i>Myh7</i>	Myosin Heavy Chain 7	Mm00600555_m1
<i>NppA</i>	Natriuretic Peptide A	Mm01255747_g1
<i>NppB</i>	Natriuretic Peptide B	Mm01255770_g1
<i>Opa1</i>	OPA1 mitochondrial dynamin like GTPase	Mm1349707_g1
<i>S1pr1</i>	Sphingosine 1-phosphate receptor 1	Mm00514644_m1
<i>S1pr3</i>	Sphingosine 1-phosphate receptor 3	Mm00515669_m1
<i>Sod2</i>	Superoxide dismutase 2, mitochondrial (MnSOD)	Mm01313000_m1
<i>Sphk1</i>	Sphingosine Kinase 1	Mm00448841_g1
<i>Sphk2</i>	Sphingosine Kinase 2	Mm00445021_m1
<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor α	Mm99999068_m1
<i>Xbp1</i>	X-Box Binding Protein 1	Mm00457357_m1

Tabla 7. Listado de sondas TaqMan utilizadas para el análisis de expresión génica en miocardio de los modelos animales de DM2

3.5.3b Análisis Western blot

Los tejidos de los ratones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido después de la extracción y se homogeneizaron en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contenía 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 10 mM de EDTA y un cóctel completo de inhibidores de proteasas (P8340-Sigma Aldrich). Una vez homogeneizados, los extractos de tejido se centrifugaron a 13.000 g y 4°C durante 5 min, y se recogieron los sobrenadantes. La concentración de proteínas del sobrenadante se evaluó mediante la técnica del ácido bicinonínico (*kit* de ensayo de proteínas BCA; Pierce Biotechnology Inc.). Una muestra de proteínas (25 g) diluida 1:10 (v:v) se cargó en geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Los *Western blots* se realizaron siguiendo los procedimientos estandarizados. Después de la electroforesis, los geles (Cat. N° 161-0185, Bio-Rad) se electrotransfirieron a membranas (Cat. N° 1704157, Bio-Rad), y las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (Cat. N° 170-6404, Bio-Rad) en solución salina tamponada con Tris-HCl suplementada con Tween-20 (TBS-T; TBS con 1% de Tween-20) y se incubaron con anticuerpos primarios siguiendo las instrucciones comerciales. Después de tres lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente en solución de bloqueo en TBS-T y la señal se detectó con un lector láser (Oddisey). La abundancia relativa de cada proteína se calculó tomando como referencia de carga la intensidad de señal obtenida tras la incubación de las membranas con una solución Pounceau, excepto por la diana S1PR1 que se incubó con un anticuerpo anti- β -actina de ratón (Tabla 8). Los análisis de densitometría de las imágenes digitalizadas fueron realizadas utilizando el *Fiji software* (*Image J*).

Anticuerpos	Referencia
Actina β (ratón)	Sta. Cruz sc-47778 Dilución 1: 1000
ATF-6 (conejo)	Millipore 09-069 Dilución 1: 1000
BIP (conejo)	Abcam ab108615 Dilución 1: 1000
CD36 (ratón)	Novus Biologicals NB600-1423 Dilución 1: 1000
eIF2α (conejo)	Cell signaling 9722 Dilución 1: 1000
LC3B (conejo)	Invitrogen PA1-1693 Dilución 1: 1000
LRP-1 (conejo)	Abcam ab92544 Dilución 1: 10000
pAKT308 (conejo)	Cell signaling 4056 Dilución 1: 1000
pAKT473 (conejo)	Cell signaling 4060 Dilución 1: 1000
pIRE1α (conejo)	Cell signaling 3294 Dilución 1: 1000
SOCS3 (conejo)	Cell signaling 52113 Dilución 1: 1000
S1PR1 (ratón)	Millipore MABC94 Dilución 1: 1000

Tabla 8. Listado de anticuerpos utilizados para el análisis de la abundancia relativa de proteínas mediante *Western blot* en miocardio de los modelos animales

3.6 Ensayos *in vitro*

Estos ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en células AC16 (cardiomiocitos humanos) (Cat. N° SCC109, Millipore). El cultivo se realizó manteniéndolas a una temperatura de 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ con humedad relativa del 90% y en botellas T75 para cultivo primario.

Para el mantenimiento y expansión de los cardiomiocitos AC16 se utilizó medio de cultivo DMEM-F12 Ham (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*) (Cat. N° D6434-500ML, Sigma Aldrich) suplementado con L-glutamina (Cat. N° X0550-100, Biowest), 12,5% de suero fetal bovino (FBS) (F7524-500ML, Sigma Aldrich) y 1% penicilina-estreptomicina (Cat. N° H3DE17-602E, Lonza) y posterior a la tripsinización con tripsina-EDTA (Cat. N° L0940-100, Biowest) se sembraron en placas para las diferentes pruebas.

Las células se dividieron y sembraron en placas de 96 pocillos (Sarstedt) a razón de 50.000 células por pocillo para las pruebas de citotoxicidad celular; para las pruebas de morfología, captación diferencial de LDL, análisis de inflamación y apoptosis, se emplearon placas de 6 (150.000 células) o 12 (100.000 células) pocillos para cultivo primario. En todos los casos, se esperó a que el cultivo alcanzara un 90% de confluencia antes de aplicar los tratamientos correspondientes.

La solución madre de glucosa (2 M) se disolvió en medio de cultivo EMEM (del inglés, *Eagle's Minimum Essential Medium*) (Cat. N° H3BE12-611F, Lonza) no suplementado. Se ha descrito el empleo de la combinación de PA y OA (PA/OA) para tratar cardiomiocitos simulando condiciones de DM2 *in vitro*, con un porcentaje menor de citotoxicidad en comparación con el uso de PA, se ensayó una condición diabética con la mezcla de ácidos grasos mencionada más arriba, a diferentes concentraciones. Las condiciones de cultivo celular que mimetizan el contexto diabético *in vitro*

se alcanzaron añadiendo suficiente cantidad de la solución madre de glucosa hasta una concentración final de 25 mM y PA o PA/OA preparados, al medio de cultivo EMEM, previamente suplementado con 1% de FBS y 2% albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos (Cat. N° A6003-25G, Sigma Aldrich).

3.6.1 Ensayos de citotoxicidad celular en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones simulando DM2 en presencia de concentraciones crecientes de PA y PA/OA

La prueba de citotoxicidad es una medida indirecta de toxicidad, ya que se basa en evaluar la actividad celular a través de la medición de la conversión de un sustrato. En este caso empleamos el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio) basado en la conversión del MTT por las células vivas, en cristales de formazán, lo que determina la actividad mitocondrial.

De forma a evaluar el efecto citotóxico del PA y de la mezcla equimolar de PA/OA en las condiciones con glucosa normal (5,5 mM) o elevada (25mM), se utilizaron concentraciones crecientes de PA y PA/OA y las células se incubaron por 24 h. Estos medios se prepararon según se representa en la Tabla 9 y se emplearon para el tratamiento de las células sembradas en placas de 96 pocillos.

Tratamiento	Medio de cultivo	Suplementos
Glucosa normal	EMEM base	1% FBS; 2% BSA; concentración de glucosa 5,5 mM propia del medio de cultivo
Glucosa normal + PA	EMEM base	1% FBS; 2% BSA; PA 0,20; 0,40 y 1,00 mM; concentración de glucosa 5,5 mM propia del medio de cultivo
Glucosa normal + PA/OA	EMEM base	1% FBS; 2% BSA; PA/OA 0,20; 0,40 y 1,00 mM; concentración de glucosa 5,5 mM propia del medio de cultivo
DM	EMEM base	1% FBS; 2% BSA; glucosa 25 mM final
DM + PA	EMEM base	1% FBS; 2% BSA; glucosa 25 mM final; PA 0,20; 0,40 y 1,00 mM

DM + PA/OA	EMEM base	1% FBS; 2% BSA; glucosa 25 mM final; PA/OA 0,20; 0,40 y 1,00 mM
Control positivo	DMEM-F12 completo	-----
Control negativo	DMEM-F12 completo	1% SDS

Tabla 9. Medios de tratamientos empleados en el ensayo de citotoxicidad celular con cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2

Se emplearon triplicados por condición y se realizaron tres ensayos independientes con pases diferentes, aunque próximos. De cada placa se descartó el medio de cultivo y posterior a ello, en cada pocillo se añadió 200 μ L del tratamiento correspondiente, se mantuvieron los cultivos en incubador, en una atmósfera a 37°C y 5% de CO₂. Pasadas 24 h, se descartaron los medios y se añadieron 100 μ L de medio de cultivo DMEM-F12 completo, 10 μ L de MTT 10 mM (Cat N° 57360-69-7, Sigma Aldrich) dejándose en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 h.

Posteriormente, se descartaron 75 μ L de medio de cada pocillo y se añadieron 100 μ L de DMSO a cada pocillo. Se dejó incubando a 37°C y 5% de CO₂ por 10 min, tras lo cual se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Beckman Coulter AD340, a una longitud de onda de 570 nm, restando la absorbancia del filtro de referencia a 650 nm.

3.6.2 Ensayo de acumulación de vesículas lipídicas en cardiomiocitos humanos AC16

Los ensayos de acumulación de vesículas lipídicas se llevaron a cabo en cardiomiocitos AC16 sembradas sobre lentillas de vidrio previamente sometidas a un tratamiento para recubrirlas y lograr mejor adherencia de las células para garantizar la resistencia a la posterior fijación y tinción.

Para el estudio de la esteatosis en cardiomiocitos AC16 inducida por PA/OA en condiciones miméticas de DM2, se emplearon concentraciones crecientes de la mezcla equimolar de PA/OA 0,2 mM; 0,4 mM y 1 mM. En

segundo lugar, para evaluar el efecto de las LDLox sobre la acumulación de vesículas lipídicas, se emplearon concentraciones crecientes de estas lipoproteínas y la mezcla equimolar de PA/OA a una concentración subcitotóxica final de 0,4 mM. En ambos diseños experimentales las células fueron expuestas durante 12 h a los estímulos.

3.6.2.1 Fijación y tinción de vesículas lipídicas con Oil Red O (ORO) en cardiomiocitos humanos AC16

Para evaluar la acumulación de lípidos se procedió a la tinción ORO (Cat. N° O0625-25G, Sigma Aldrich) de las células fijadas. Esta técnica permite teñir los lípidos de rojo, de forma que puedan ser visualizados.

Cada pocillo de la placa se lavó 2 veces con PBS pH=7,4, posteriormente se añadió 500 µL de formalina al 10% y se dejó actuar por 30 min para la fijación de las células. Seguidamente se descartó la formalina de cada pocillo y se añadió a cada uno 500 µL de isopropanol al 60% durante 1 min. Se descartó el isopropanol y se adicionó 500 µL de ORO preparado con anterioridad (0,5 g de ORO disuelto en 200 mL de isopropanol durante 1 h en agitación a 56°C) durante 15 min. Se lavó con 500 µL de agua destilada y se tiñó con 200 µL de solución de hematoxilina (Cat. N° MHS16-500 ML, Sigma Aldrich) durante 3 min. Finalmente, se lavó con 500 µL de agua de grifo y luego con igual cantidad de agua destilada.

A través del microscopio óptico (Zeiss) se capturaron micrografías con la lente de inmersión (100x). La cuantificación de las vesículas lipídicas se realizó mediante el *software* AxioVision Rel 4.8, en donde se utilizó la herramienta de medición “*outline*”, para cuantificar el área de las vesículas lipídicas y el de las células, en µm², teniendo como referencia la escala de 10 µm.

3.6.3 Análisis de la captación de LDLox en cardiomiocitos humanos AC16

Las células fueron sembradas en las placas con lentillas (100.000 células por pocillo) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂, una vez que alcanzaron la densidad celular adecuada, se trataron con los medios de cultivo que mimetizaron el contexto de hiperglicemia (glucosa 25 mM).

Se emplearon LDL, LDLnat y LDLox, marcadas con el fluorocromo Dil y puestas en contacto con los cultivos celulares de cardiomiocitos, en presencia de inhibidores. En este estudio utilizamos como un inhibidor selectivo del LDLR una forma recombinante de la proteína RAP (del inglés, *Receptor-Associated Protein*) que se produjo y purificó en el laboratorio del Dr. Pablo Fuentes en nuestro instituto, este bloquea la acción del receptor de LDL y también de LRP1. Por otro lado, como inhibidor de CD36 se utilizaron SSO (Sulfo-N-Succinimidil Oleato, Cat. N° SML2148-25MG, Merck) que se une irreversiblemente al receptor bloqueando su función *in vitro* y tamoxifeno (TAM) (Cat. N° T2859-0.5G, Merck). Las concentraciones finales tanto de las LDL como de los inhibidores selectivos utilizados para los ensayos y el tiempo de incubación se fijaron mediante pruebas piloto previas.

3.6.4 Análisis del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación inducida por PA en cardiomiocitos humanos AC16

A fin de evaluar si el tratamiento con la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod ejercía algún efecto protector contra la inflamación inducida por PA, se emplearon los cardiomiocitos humanos AC16. Tras una prueba piloto para determinar el tiempo de exposición y la concentración de PA a utilizar para la inducción de inflamación, se fijaron las condiciones de los ensayos posteriores; PA a una concentración de 0,4 mM y el tiempo de exposición a 16 h.

Para analizar el efecto de la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod (Cat. N° CAY-10006408. 1MG, Cayman Chemicals) sobre los cardiomiocitos, se procedió a sembrar células en placas de 12 pocillos e incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Al alcanzar la densidad celular adecuada, los cardiomiocitos se incubaron con la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod disuelta en una solución madre en DMSO a 1mM y llevada a concentración final de 100 nM en medio DMEM suplementado con 1% FBS y 2% BSA (se realizaron pruebas piloto para fijar esta concentración del fármaco, datos no mostrados) durante 1 h previo al estímulo del PA 0,4 mM. Como control, se emplearon cardiomiocitos AC16 expuestos al vehículo empleado para el fármaco y el PA (DMSO y etanol).

Al transcurrir 16 h de exposición, se recolectaron los sobrenadantes de los cardiomiocitos y se almacenaron a -80°C, hasta el análisis de las concentraciones de citoquinas IL-6 (Cat N° DY206, Biotechne) y TNF α (Cat. N° DY210, Biotechne) mediante *kits* ELISA comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante en colaboración con la Dra. Mercedes Camacho.

3.6.5 Análisis del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis inducida por PA en cardiomiocitos humanos AC16 mediante citometría de flujo

Para explorar si el FTY720/Fingolimod ejercía un efecto anti-apoptótico en cardiomiocitos humanos, se realizaron pruebas piloto (datos no mostrados) en las que se expusieron estas células a diferentes concentraciones de PA y tiempos de exposición para la inducción de apoptosis.

Una vez fijadas las condiciones de ensayo (PA 0,4 mM y t=12h), se sembraron células en placas de 12 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Al conseguir la densidad celular conveniente, los cardiomiocitos se

incubaron con la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod llevada a concentración final de 100 nM en medio DMEM suplementado con 1% FBS y 2% BSA durante 1 h previo al estímulo del PA. Como control, se emplearon cardiomiocitos AC16 expuestos al vehículo empleado para el fármaco y el PA. Posteriormente se procedió al marcaje de las células con Anexina V e ioduro de propidio (Cat. N° A10788, Invitrogen), según el protocolo descrito por la casa comercial, y detectar las células marcadas con los anticuerpos utilizando el citómetro de flujo (MacsQuant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

3.7 Análisis estadístico

En general los datos se presentan como media \pm desviación estándar de la media. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graph Pad Prism (GPAD, versión 8.0, San Diego, CA, USA). Las diferencias entre los grupos de ratones obesos y no obesos se determinaron mediante una prueba t de Mann-Whitney, sobre los parámetros corporales, bioquímicos plasmáticos y tisulares, los niveles de expresión génica y la abundancia relativa de proteínas.

En lo que respecta a los modelos de DM2 (db/db y db/db_{cat}) en comparación con los no diabéticos (db/+), sobre los parámetros corporales, bioquímicos plasmáticos y tisulares, los niveles de expresión génica y la abundancia relativa de proteínas; se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn o un ANOVA paramétrico de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, según el caso.

Las relaciones entre las distintas variables se determinaron calculando los coeficientes de correlación de Pearson. En todos los casos, las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor P era $<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de modelos animales de CMD

4.1.1 Parámetros corporales y fenotipo

Ratones obesos

En la Tabla 10 se presentan los parámetros corporales medidos en el modelo de prediabetes, ratones obesos (db/+, alimentados con dieta rica en grasas durante 5 meses) en comparación con los ratones no obesos (db/+, alimentados con dieta de mantenimiento por 5 meses).

Parámetros corporales	No obeso	Obeso	P
Peso corporal (g)	33,84 ± 0,85	42,81 ± 1,09 *	<0,05
Consumo de dieta (g/día)	2,76 ± 0,14	2,43 ± 0,20	0,17
Consumo de bebida (mL/día)	4,69 ± 0,31	4,01 ± 0,21	0,14
Hígado (g)	1,43 ± 0,09	2,18 ± 0,24 *	<0,05
Hígado/peso corporal	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,47
Riñones (mg)	450 ± 25,26	424 ± 8,09	0,55
Pulmones (mg)	165 ± 7,04	168 ± 3,69	0,52
Corazón (mg)	162 ± 6,87	183 ± 4,37 *	<0,05
Corazón/peso corporal	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,16
Longitud de tibia (mm)	19 ± 0,18	19 ± 0,22	0,49
Corazón/longitud de tibia	8,63 ± 0,43	9,89 ± 0,26 *	<0,05
Tejido adiposo pericárdico (g)	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,06
Tejido adiposo epididimal (g)	1,10 ± 0,07	2,42 ± 0,16 *	<0,05
Tejido adiposo total (g)	3,91 ± 0,22	7,40 ± 0,41 *	<0,05

Tabla 10. Parámetros corporales en ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=7-18 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. A los 2 meses de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta de mantenimiento o con una dieta rica en grasas. Se midió la ingesta de comida y agua al final del estudio, como se describe en Materiales y Métodos. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de

Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo no obeso.

En los ratones db/+ alimentados con dieta rica en grasas, se indujo obesidad revelada por el aumento significativo del peso corporal (~1,28 veces, $p < 0,05$) en comparación con los ratones no obesos, independiente a que los grupos no exhibieron diferencias en la ingesta. Este incremento de peso fue causado principalmente por el aumento de la adiposidad total (~1,89 veces; $p < 0,05$) respecto al no obeso y consecuentemente del mayor depósito en el tejido adiposo epididimal (~2,20 veces; $p < 0,05$). Además, este fenotipo de obesidad inducida por la dieta cursó con aumentos en el peso del hígado y del corazón (~1,52 veces; $p < 0,05$; ~1,13 veces; $p < 0,05$, respectivamente), en comparación con los del grupo alimentado con dieta de mantenimiento.

Ratones diabéticos

Como era de esperar en el modelo de DM2, db/db, el peso corporal fue mayor (~1,57 veces, $p < 0,05$) en comparación con los ratones del grupo no diabético (db/+) (Tabla 11). Este modelo animal cursó con polifagia y polidipsia, signos característicos de la DM y efectivamente, se observó un incremento en el consumo de comida y bebida en estos animales (consumo de comida: ~3,73 veces; $p < 0,05$ y bebida: ~8,12 veces; $p < 0,05$; respecto a los ratones no diabéticos).

Sorprendentemente observamos un fenotipo distinto en un subgrupo de animales db/db, que durante el seguimiento mostraron una resistencia a la ganancia de peso como los otros congéneres (db/db) en algunos casos y en otros experimentaron una regresión en su peso corporal, resultando al final del período de seguimiento (4 meses de edad), en una pérdida de peso y de adiposidad (Tabla 11). Cabe destacar que esto último no se relacionó con cambios en la ingesta ni en el consumo de bebida, en comparación con la pauta mostrada por el grupo db/db. Por ello optamos

por estudiarlos como un grupo separado, ya que mostraron signos más acentuados característicos de la DM2, y los denominamos diabéticos catabólicos (db/db_{cat}). En este grupo, se presentó una disminución significativa del peso corporal (~27%; p<0,05), en comparación con el modelo de db/db, y no difirió del promedio de peso del grupo db/+ (no diabético).

En cuanto al peso del hígado, éste se incrementó significativamente en ambos grupos de ratones diabéticos (~2,03 veces db/db y ~1,78 veces db/db_{cat}; p<0,05 respectivamente) en comparación con los ratones db/+. El fenotipo db/db_{cat} también presentó un aumento del peso del riñón (~1,30 veces; p<0,05) respecto al grupo db/+.

La adiposidad fue significativamente mayor en ambos grupos de ratones diabéticos (tejido adiposo total: ~5,84 veces en db/db; ~3,24 veces en db/db_{cat}; p<0,05 respectivamente) en comparación con los ratones de no diabéticos. Sin embargo, el modelo db/db_{cat} presentó una menor acumulación de tejido adiposo total respecto al db/db (~45%, p<0,05) y, por ende, se acompañó de cambios significativos a la baja en los tejidos adiposo epididimal (~31%; p<0,05) y pericárdico (~45%; p<0,05) en comparación con sus congéneres del modelo db/db.

Parámetros corporales	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
Peso corporal (g)	29,24 ± 0,60	45,88 ± 1,26 *	33,64 ± 1,22 †	<0,05
Consumo de dieta (g/día)	2,59 ± 0,21	9,68 ± 1,07 *	10,17 ± 4,82	<0,05
Consumo de bebida (mL/día)	4,41 ± 0,25	35,82 ± 3,91 *	26,06 ± 4,17 *	<0,05
Hígado (g)	1,27 ± 0,03	2,58 ± 0,10 *	2,26 ± 0,08 *	<0,05
Hígado/peso corporal	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00 *	0,07 ± 0,00 *	<0,05
Riñones (mg)	361 ± 8,56	410 ± 18,61	468 ± 31,29 *	<0,05
Pulmones (mg)	140 ± 5,62	139 ± 5,62	145 ± 4,47	0,46
Corazón (mg)	155 ± 4,23	144 ± 4,33	142 ± 3,63	0,08
Corazón/peso corporal	0,005 ± 9,70e-01	0,003 ± 6,80e-01 *	0,004 ± 0,05 †	<0,05
Longitud de tibia (mm)	19 ± 0,24	18 ± 0,15 *	17 ± 0,18 *	<0,05
Corazón/longitud de tibia	8,27 ± 0,21	8,15 ± 0,28	8,27 ± 0,30	0,70
Tejido adiposo pericárdico (g)	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,01 *	0,06 ± 0,01 †	<0,05
Tejido adiposo epididimal (g)	0,64 ± 0,04	2,35 ± 0,10 *	1,62 ± 0,09 * †	<0,05
Tejido adiposo total (g)	2,19 ± 0,15	12,80 ± 0,68 *	7,10 ± 0,64 * †	<0,05

Tabla 11. Parámetros corporales medidos en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=10-17 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 4 meses de edad. A los 2 meses de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta de mantenimiento. Se midió la ingesta de comida y agua al final del estudio, como se describe en Materiales y Métodos. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db.

4.1.1a Bioquímica plasmática

Ratones obesos

Este modelo de prediabetes e insulinoresistencia se acompañó de un aumento de los niveles de colesterol total (~2,25 veces; $p < 0,05$) (Tabla 12). En cuanto a los niveles de las enzimas hepáticas, hubo un incremento de las mismas (ALT: ~2,68 veces; $p < 0,05$; AST: ~2 veces; $p < 0,05$) y de los parámetros renales (BUN: ~1,36 veces; $p < 0,05$) respecto al grupo no obeso, lo que sugeriría alteraciones hepáticas y renales en los ratones obesos (Tabla 12).

Bioquímica plasmática	No obeso	Obeso	P
ALT (U/L)	37 ± 6,17	99 ± 19,26 *	<0,05
AST (U/L)	100 ± 12,64	200 ± 32,03 *	<0,05
Creatinina (µM)	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,12
BUN (µM)	5,45 ± 0,22	7,38 ± 0,28 *	<0,05
Colesterol total (mM)	2,58 ± 0,08	5,80 ± 1,12 *	<0,05
Colesterol HDL (mM)	2,04 ± 0,07	4,10 ± 1,01	0,08
Colesterol no-HDL (mM)	0,53 ± 0,05	1,70 ± 0,26 *	<0,05
Triglicéridos (mM)	0,73 ± 0,05	0,63 ± 0,06	0,30
AGL (mM)	0,89 ± 0,04	0,85 ± 0,06	0,22

Tabla 12. Parámetros bioquímicos medidos en el plasma de los ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=7-18 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. A los 2 meses de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta de mantenimiento o con una dieta rica en grasas. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso. Abreviaturas: ALT (Alanina aminotransferasa); AST (Aspartato aminotransferasa); BUN (del inglés, *Blood Urea Nitrogen*); HDL (del inglés, *High-Density Lipoprotein*); AGL (Ácidos Grasos Libres).

Ratones diabéticos

En lo que se refiere a la bioquímica plasmática se observó un aumento de los niveles de colesterol total (~1,24 veces; $p < 0,05$ en db/db y ~1,25 veces; $p < 0,05$ en db/db_{cat}) en ambos grupos diabéticos, principalmente por el incremento en el colesterol HDL (~1,44 veces; $p < 0,05$) en db/db en comparación con los ratones no diabéticos (Tabla 13). En la fracción de no-HDL, es llamativo el aumento significativo observado en el modelo de diabetes catabólica (~1,79 veces; $p < 0,05$) en comparación con modelo db/db.

Bioquímica plasmática	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
ALT (U/L)	36 ± 2,87	185 ± 30,78 *	148 ± 25,68 *	<0,05
AST (U/L)	153 ± 23,43	359 ± 65,02 *	286 ± 50,46 *	<0,05
Creatinina (µM)	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00 *	0,06 ± 0,00 *	<0,05
BUN (µM)	5,47 ± 0,30	6,75 ± 0,56	6,50 ± 0,50	0,27
Colesterol total (mM)	2,58 ± 0,05	3,20 ± 0,16 *	3,22 ± 0,19 *	<0,05
Colesterol HDL (mM)	1,89 ± 0,09	2,73 ± 0,12 *	2,37 ± 0,17	<0,05
Colesterol no-HDL (mM)	0,68 ± 0,06	0,47 ± 0,06	0,84 ± 0,11 †	<0,05
Triglicéridos (mM)	0,86 ± 0,08	1,49 ± 0,12 *	1,45 ± 0,15 *	<0,05
AGL (mM)	0,94 ± 0,06	1,22 ± 0,12	1,46 ± 0,16	0,10

Tabla 13. Parámetros bioquímicos medidos en el plasma de los ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=11-14 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo de control. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+; † $p < 0,05$ frente al grupo db/db.

Los ratones diabéticos presentaron una mayor dislipidemia, como demuestra el marcado aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos (~1,73 veces; $p < 0,05$; ~1,69 veces; $p < 0,05$; en db/db y db/db_{cat}, respectivamente) en comparación con los ratones no diabéticos.

Los modelos animales de diabetes cursaron con alteraciones en las enzimas hepáticas (ALT: ~5,13 veces y ~4,11 veces; $p < 0,05$; AST: ~2,34 y 1,86 veces $p < 0,05$ en db/db y db/db_{cat}, respectivamente) y en los parámetros de la función renal (creatinina: ~1,66 veces y ~2 veces; $p < 0,05$ en db/db y db/db_{cat}, respectivamente), todo esto en comparación con los ratones no diabéticos.

4.1.1b Metabolismo de la Glucosa

Ratones obesos

En los ratones con obesidad inducida por la alimentación con la dieta rica en grasas, la bioquímica plasmática mostró alteración de la señalización de la insulina, revelada por la hiperinsulinemia (insulina: ~2,15 veces; $p < 0,05$ Tabla 14), comparada con el no obeso. Los demás parámetros medidos no exhibieron modificaciones en este modelo animal.

Bioquímica plasmática	No obeso	Obeso	P
Glucosa (mM)	11,93 ± 0,27	11,88 ± 0,28	0,89
Insulina (ng/L)	0,81 ± 0,10	1,74 ± 0,27 *	<0,05
Glucosa x insulina	4,79 ± 1,09	5,87 ± 0,89	0,65
Adipo-IR	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,12
Adiponectina (ng/mL)	3621 ± 570	3802 ± 408	0,56

Tabla 14. Parámetros bioquímicos de la homeostasis de la glucosa, medidos en el plasma de los ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=8-11 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. A los 2 meses de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta mantenimiento o con una dieta rica en grasas. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso.

A continuación se muestran los resultados de la evaluación del metabolismo de la glucosa en los ratones obesos en comparación con los no obesos.

Como cabía esperar el grupo con obesidad presentó un metabolismo de la glucosa alterado (Figura 11), dado el aumento significativo en el área bajo la curva respecto a los no obesos.

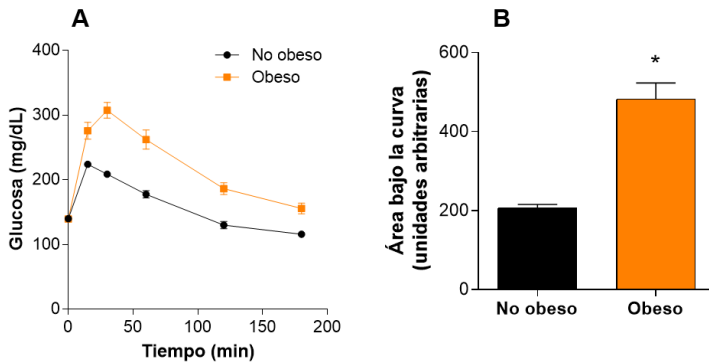


Figura 11. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa, en ratones no obesos y obesos

A) la prueba de PTOG se realizó en ratones de 4 h de ayuno. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min después de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg). B) Área bajo la curva de las curvas asociadas al PTOG (n=5 ratones por grupo). Los ratones tenían 7 meses de edad y la prueba se realizó una semana antes de la eutanasia. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo no obeso. Abreviatura: PTOG (Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa).

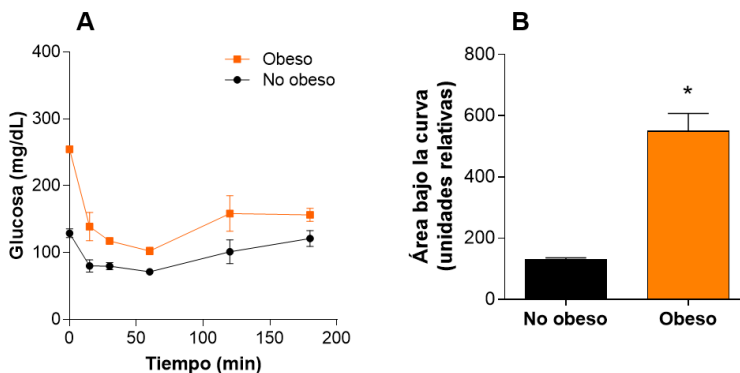


Figura 12. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia a la Insulina, en ratones no obesos y obesos

A) la prueba de PTI se realizó en ratones de 4 h de ayuno. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min después de una inyección intraperitoneal de insulina (0,9 U/kg). B) Área bajo la curva de las curvas asociadas al PTI (n=5 ratones por grupo). Los ratones tenían 7 meses de edad y la prueba se realizó una semana antes de la eutanasia. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos

para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo no obeso. Abreviatura: PTI (Prueba de Tolerancia a la Insulina).

La captación de glucosa estimulada por la insulina en los ratones obesos disminuyó significativamente respecto al grupo no obeso, sugiriendo así que la sensibilidad a la insulina se encuentra afectada en este modelo de prediabetes (Figura 12).

Ratones diabéticos

En los modelos de ratones diabéticos, como era de esperar, la bioquímica plasmática reveló hiperglucemia (Tabla 15) en ambos grupos (glucosa: $\sim 4,36$ veces y $\sim 4,65$ veces; $p < 0,05$ en db/db y db/db_{cat}, respectivamente) en comparación con los controles no diabéticos. Esto acompañado por el aumento significativo en las concentraciones de insulina en los db/db respecto al control (insulina: $\sim 3,68$ veces, $p < 0,05$). La concentración de insulina en plasma de ratones db/db_{cat} aunque disminuida fue comparable a la del no diabético; por otro lado, se observó una disminución significativa respecto al db/db (insulina: $\sim 62\%$, $p < 0,05$).

Concomitantemente, en el modelo db/db se presentaron incrementos en el parámetro de Glucosa x Insulina ($\sim 13,48$ veces, $p < 0,05$) y Adipo-IR ($\sim 6,00$ veces; $p < 0,05$), que comúnmente revelan la resistencia global a la insulina y la específica del tejido adiposo, respecto a los no diabéticos. En los ratones db/db_{cat}, la Glucosa x Insulina se encontró significativamente aumentado ($\sim 7,43$ veces, $p < 0,05$) comparado al grupo no diabético. Sin embargo, el índice Adipo-IR no presentó cambios significativos respecto al no diabético. En cuanto a los niveles de adiponectina detectados en estos grupos experimentales, se observó una disminución significativa ($\sim 37\%$; $p < 0,05$) en el modelo db/db_{cat} respecto al grupo db/+.

Bioquímica plasmática	db/+	DM2 met.	DM2 cat.	P
Glucosa (mM)	10,51 ± 0,51	45,89 ± 2,13 *	48,85 ± 1,55 *	<0,05
Insulina (ng/L)	0,59 ± 0,08	2,17 ± 0,36 *	0,82 ± 0,12 †	<0,05
Glucosa x Insulina	2,92 ± 0,53	39,35 ± 8,46 *	21,70 ± 3,14 *	<0,05
Adipo-IR	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,01 *	0,03 ± 0,01	<0,05
Adiponectina (ng/mL)	3676 ± 247	3110 ± 542	2310 ± 216 *	<0,05

Tabla 15. Parámetros bioquímicos de la homeostasis de la glucosa, medidos en el plasma de los ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=10-12 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+; † p<0,05 frente al grupo db/db.

Para evaluar el metabolismo de la glucosa en los dos modelos animales de diabetes, db/db y db/db_{cat}, en comparación con los no diabéticos, también realizamos una PTOG y la de PTI, en los ratones a 4 meses de edad (una semana antes del final del seguimiento). Como se muestra en la figura 13, ambos grupos de animales db/db y db/db_{cat}, presentaron un patrón metabólico de la glucosa alterado, revelado por el aumento en el área bajo la curva respecto a los controles no diabéticos.

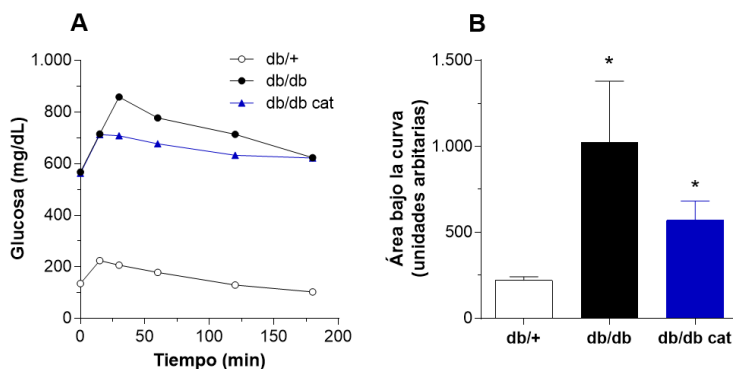


Figura 13. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa, en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

A) la prueba de PTOG se realizó en ratones de 4 h de ayuno. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min después de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg). B) Área bajo la curva de las curvas asociadas al PTOG (n=7-11 ratones por grupo). Los ratones tenían 4 meses de edad y la prueba se realizó una semana antes de la eutanasia. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+. Abreviatura: PTOG (Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa).

En cuanto a la captación de glucosa estimulada por la insulina, esta se encontró disminuida en los modelos diabéticos estudiados (Figura 14). Lo que sugiere alteraciones en la sensibilidad a la insulina en los ratones diabéticos tanto metabólicos como catabólicos, respecto al grupo no diabético.

En conjunto, nuestros resultados mostraron una perturbación en la homeostasis de la glucosa en los modelos animales de DM2 empleados.

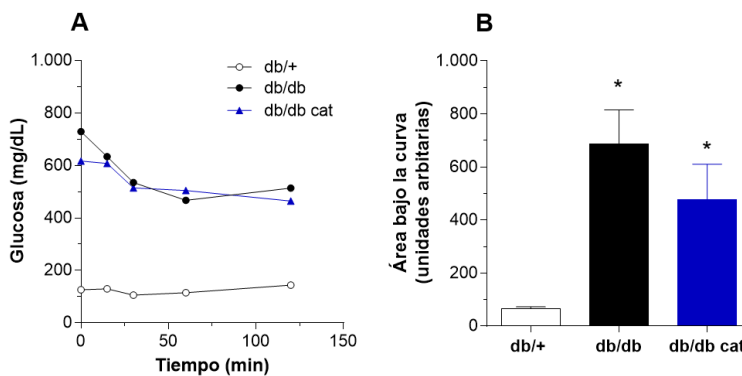


Figura 14. Análisis funcional del metabolismo de la glucosa: Prueba de Tolerancia a la Insulina, en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

A) la prueba de PTI se realizó en ratones de 4 h de ayuno. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 0, 15, 30, 60 y 120 min después de una inyección intraperitoneal de insulina (0,9 U/kg). B) Área bajo la curva de las curvas asociadas al PTI (n=7-11 ratones por grupo). Los ratones tenían 4 meses de edad y la prueba se realizó una semana antes de la eutanasia. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+. Abreviatura: PTI (Prueba de Tolerancia a la Insulina).

4.1.1c Funcionalidad cardíaca

Ratones obesos

La exploración de la funcionalidad cardíaca se abordó mediante ecocardiografía, analizando las funciones sistólica y diastólica.

A pesar de la disminución significativa en el tiempo de eyección de la válvula mitral (MV ET: 26%; $p < 0,05$) en los ratones obesos, en general la función diastólica no se encontró alterada en el modelo de obesidad inducida por la dieta rica en grasas, en comparación con los del grupo no obeso (Tabla 16).

Parámetros Función diastólica	No obeso	Obeso	P
AET (ms)	52,77 ± 2,56	48,30 ± 2,68	0,23
IVCT (ms)	15,78 ± 1,28	18,24 ± 2,18	0,73
IVRT (ms)	21,99 ± 0,55	21,45 ± 1,34	0,70
MV A (mm/s)	435,7 ± 21,69	369,3 ± 42,76	0,63
MV E (mm/s)	732,2 ± 29,47	658,2 ± 64,30	0,29
MV ET (ms)	78,87 ± 4,82	57,95 ± 1,72 *	<0,05
MV E/A	1,69 ± 0,05	1,83 ± 0,08	0,37

Tabla 16. Análisis de la función diastólica medidos en ratones no obesos y obesos

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=7 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo no obeso. Abreviaturas: AET (del inglés, *Aortic Ejection Time*); IVCT (del inglés, *Isovolumetric Contraction Time*); IVRT (del inglés, *Isovolumetric Relaxation Time*); MV A (del inglés, *Mitral A-wave velocity*); MV E (*Mitral E-wave velocity*); MV ET (del inglés, *Mitral Valve Ejection Time*); MV E/A (del inglés, *Mitral valve E/A ratio*).

La función sistólica se encontró preservada en este modelo animal, revelada por el porcentaje de las fracciones de eyección (%EF) y acortamiento (%FS) que se mantuvieron a niveles similares a los ratones no obesos (Tabla 17). El hallazgo más interesante en este modelo fue el

aumento significativo de la masa del ventrículo izquierdo (~1,43 veces; $p < 0,05$) respecto al grupo no obeso. Esto se acompañó del incremento en el diámetro interno del ventrículo tanto en sístole (LVID) (~1,21 veces; $p < 0,05$) como en diástole (~1,17 veces; $p < 0,05$), reflejando así cambios en el remodelado cardíaco.

Parámetros Función sistólica	No obeso	Obeso	P
LVAW (d) (mm)	0,95 ± 0,06	0,99 ± 0,05	0,47
IVS (d) (mm)	0,86 ± 0,08	0,91 ± 0,05	0,94
LVID (d) (mm)	3,66 ± 0,10	4,28 ± 0,10 *	<0,05
LVPW (d) (mm)	0,88 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,29
LVAW (s) (mm)	1,35 ± 0,11	1,45 ± 0,05	0,51
IVS (s) (mm)	1,38 ± 0,07	1,32 ± 0,06	0,84
LVID (s) (mm)	2,56 ± 0,18	3,11 ± 0,18 *	<0,05
LVPW (s) (mm)	1,21 ± 0,11	1,30 ± 0,04	0,23
%EF	62,33 ± 6,55	53,55 ± 4,18	0,43
%FS	33,94 ± 4,71	27,74 ± 2,45	0,43
LV mass (mg)	117 ± 3,45	168 ± 16,25 *	<0,05
LV vol (d) (μL)	60,24 ± 2,42	82,79 ± 4,63 *	<0,05
LV vol (s) (μL)	23,12 ± 4,53	39,38 ± 6,14 *	<0,05

Tabla 17. Análisis de la función sistólica medidos en ratones no obesos y obesos

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=7 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso. Abreviaturas: LVAW (del inglés, *Left Ventricle anterior wall*); IVS (del inglés, *Interventricular Septal Thickness*); LVID (del inglés, *Left Ventricle Internal Dimension*); LVPW (del inglés, *Left Ventricle posterior wall*); %EF (*Ejection Fraction*); %FS (*Fractional Shortening*); LV mass (del inglés, *Left Ventricle mass*); LV vol (*Left Ventricle volume*); d (diástole) y s (sístole).

Ratones diabéticos

En los modelos animales db/db y db/db_{cat} se procedió a la exploración de la funcionalidad cardíaca mediante ecocardiografía, al final del período de seguimiento (4 meses de edad). Los parámetros cardíacos de función diastólica y sistólica determinados se muestran en la tablas 18 y 19.

La función diastólica en el modelo db/db presentó varias alteraciones, entre ellas un incremento significativo (~1,27 veces; $p < 0,05$) del tiempo de relajación del ventrículo izquierdo (del inglés, *Isovolumic Relaxation Time*) respecto al no diabético (Tabla 18). Las ondas activa (onda A) y pasiva (onda E) disminuyeron en este modelo en un 42% ($p < 0,05$) y 35% ($p < 0,05$), respectivamente en comparación con los animales no diabéticos analizados a la misma edad. Este deterioro observado en el grupo diabético se acompañó además del aumento significativo (~1,31 veces; $p < 0,05$) en el tiempo de eyección de la válvula mitral (del inglés, *Mitral Valve Ejection Time*) y consecuentemente, la relación entre las ondas E/A se vio aumentada (~1,16 veces; $p < 0,05$) respecto al no diabético. Este conjunto de alteraciones indicó que el modelo animal de diabetes presentó signos de disfunción diastólica, una de las principales características de la CMD. Comprobamos con esto que el tiempo de seguimiento empleado fue adecuado para observar la presencia de esta patología, objeto de nuestro estudio.

En cuanto al modelo de diabetes más avanzada (db/db_{cat}), se observaron cambios similares a los ya descritos en ratones db/db (Tabla 18). El tiempo de relajación también se vio aumentado de manera significativa (IVRT: ~1,20 veces; $p < 0,05$) en estos animales en comparación con los no diabéticos. Curiosamente las ondas E y A aunque se encontraron ligeramente disminuidas, el cambio observado no fue significativo respecto al grupo no diabético pero sí en comparación con el grupo db/db. Este fue

un hallazgo destacable de nuestro estudio, ya que es la primera vez que se reportan datos cardíacos en este fenotipo (db/db_{cat}). A pesar de todo lo expuesto, el modelo de diabetes exacerbada también presentó un incremento significativo en la relación de las ondas E/A (~1,17 veces; p<0,05), respecto al grupo no diabético. Estos datos revelaron signos de CMD en el modelo db/db_{cat}.

Por lo tanto, tras la exploración de la funcionalidad cardíaca en ambos grupos experimentales de DM2, se puso en evidencia que estos son adecuados para el estudio de la CMD dentro del rango de edad reportado.

Parámetros Función diastólica	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
AET (ms)	55,17 ± 2,28	58,36 ± 2,42	53,59 ± 2,22	0,35
IVCT (ms)	19,78 ± 2,26	21,24 ± 1,33	18,70 ± 0,85	0,52
IVRT (ms)	23,00 ± 0,54	29,19 ± 1,01 *	27,62 ± 1,29 *	<0,05
MV A (mm/s)	412,8 ± 32,25	236,7 ± 19,32 *	337,7 ± 27,05 †	<0,05
MV E (mm/s)	639,3 ± 55,46	416,9 ± 27,49 *	600,4 ± 35,81 †	<0,05
MV ET (ms)	69,68 ± 3,12	90,94 ± 3,08 *	75,24 ± 8,74	<0,05
MV E/A	1,54 ± 0,02	1,78 ± 0,05 *	1,80 ± 0,08 *	<0,05

Tabla 18. Análisis de la función diastólica medidos en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=6-7 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+ y †p<0,05 frente al grupo db/db. Abreviaturas: AET (del inglés, *Aortic Ejection Time*); IVCT (del inglés, *Isovolumetric Contraction Time*); IVRT (del inglés, *Isovolumetric Relaxation Time*); MV A (del inglés, *Mitral A-wave velocity*); MV E (*Mitral E-wave velocity*); MV ET (del inglés, *Mitral Valve Ejection Time*); MV E/A (del inglés, *Mitral valve E/A ratio*).

En la tabla 19 se presentan los parámetros evaluados en la función sistólica. En nuestros modelos animales de DM2, se observaron que ambas fracciones de eyección %EF y acortamiento %SF (del inglés,

Ejection Fraction y *Shortening Fraction*, respectivamente), se encontraron preservadas en los grupos experimentales, db/db y db/db_{cat}, en comparación con los animales no diabéticos.

Parámetros Función sistólica	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
LVAW (d) (mm)	0,90 ± 0,08	0,70 ± 0,04 *	0,84 ± 0,03	<0,05
IVS (d) (mm)	0,91 ± 0,06	0,77 ± 0,03	0,81 ± 0,05	0,14
LVID (d) (mm)	3,88 ± 0,08	3,64 ± 0,08	3,83 ± 0,15	0,29
LVPW (d) (mm)	0,88 ± 0,03	0,74 ± 0,02 *	0,80 ± 0,03	<0,05
LVAW (s) (mm)	1,42 ± 0,08	1,22 ± 0,07	1,32 ± 0,06	0,17
IVS (s) (mm)	1,38 ± 0,08	1,20 ± 0,06	1,28 ± 0,08	0,25
LVID (s) (mm)	2,62 ± 0,14	2,60 ± 0,12	2,77 ± 0,24	0,75
LVPW (s) (mm)	1,25 ± 0,06	1,05 ± 0,03 *	1,14 ± 0,05	<0,05
%EF	61,27 ± 3,80	55,57 ± 3,05	58,34 ± 3,05	0,48
%FS	32,64 ± 2,61	28,65 ± 2,08	30,59 ± 2,20	0,48
LV mass (mg)	118,5 ± 4,28	96,26 ± 3,64 *	112,6 ± 7,56	<0,05
LV vol (d) (μL)	63,26 ± 4,54	56,24 ± 2,96	64,06 ± 6,17	0,42
LV vol (s) (μL)	25,13 ± 3,65	25,35 ± 2,60	27,21 ± 3,89	0,89

Tabla 19. Análisis de la función sistólica en ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}
 Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=6-7 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se llevaron a cabo al finalizar el tratamiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+. Abreviaturas: LVAW (del inglés, *Left Ventricle anterior wall*); IVS (del inglés, *Interventricular Septal Thickness*); LVID (del inglés, *Left Ventricle Internal Dimension*); LVPW (del inglés, *Left Ventricle posterior wall*); %EF (*Ejection Fraction*); %FS (*Fractional Shortening*); LV mass (del inglés, *Left Ventricle mass*); LV vol (*Left Ventricle volume*); d (diástole) y s (sístole).

Es importante destacar que el grupo de db/db cursó además con una disminución significativa del tamaño del ventrículo izquierdo (~18%; p<0,05) y la consecuente disminución del tamaño de la paredes anterior (LV AW, d: ~22% p<0,05) y posterior del ventrículo (LV PW, d: ~16% p<0,05), respecto al control no diabético. No obstante, en el grupo de db/db_{cat}, no se reportaron cambios a esos niveles. En conjunto esto indicó

que la función sistólica se encontró preservada en ambos modelos estudiados, otra característica distintiva de la CMD.

4.1.2 Análisis del perfil de lípidos y esfingolípidos mediante Resonancia Magnética Nuclear o Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

4.1.2a Evaluación de los niveles de lípidos en miocardio e hígado por Resonancia Magnética Nuclear

Ratones obesos

Los parámetros lipídicos miocárdicos y hepáticos se muestran en la tabla 20. No se observaron cambios significativos en la composición lipídica en miocardio de los ratones obesos comparados con los no obesos, aunque el porcentaje del colesterol libre presentó una tendencia a estar elevado en este tejido.

Lípidos en Miocardio	No obeso	Obeso	P
% Esteres de Colesterol	0,29 ± 0,04	0,34 ± 0,04	0,42
% Colesterol libre	9,98 ± 0,63	14,20 ± 2,00	0,06
% Triglicéridos	3,53 ± 1,16	2,81 ± 0,34	>0,99
% Fosfolípidos	86,20 ± 0,56	82,70 ± 2,07	0,10

Tabla 20. Análisis del perfil de lípidos en miocardio de ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

En cuanto a los parámetros lipídicos a nivel hepático, los ratones obesos cursaron con una ligera disminución en el porcentaje de colesterol libre y un marcado incremento en el porcentaje de triglicéridos respecto al grupo no obeso (Tabla 21).

Lípidos en Hígado	No obeso	Obeso	P
% Esteres de Colesterol	3,28 ± 0,30	3,73 ± 0,47	0,41
% Colesterol libre	11,00 ± 1,02	7,75 ± 0,54 *	<0,05
% Triglicéridos	15,60 ± 6,00	40,10 ± 4,80 *	<0,05
% Fosfolípidos	70,10 ± 4,91	48,40 ± 3,82 *	<0,05

Tabla 21. Análisis del perfil de lípidos en hígado de ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso.

Ratones diabéticos

En los modelos animales de DM2, también se determinaron las concentraciones de los diversos tipos de ácidos grasos, tanto en miocardio como en hígado.

En la tabla 22 se presentan los resultados del perfil de lípidos en tejido miocárdico; el grupo db/db no exhibió cambios significativos, en cambio en los ratones db/db_{cat} el porcentaje de triglicéridos se encontró aumentado respecto al no diabético.

Lípidos en Miocardio	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
% Esteres de Colesterol	0,41 ± 0,14	0,44 ± 0,11	0,83 ± 0,23	0,11
% Colesterol libre	10,06 ± 0,26	9,84 ± 0,54	9,25 ± 0,92	0,62
% Triglicéridos	4,38 ± 1,10	11,19 ± 1,23	11,42 ± 1,56 *	<0,05
% Fosfolípidos	85,14 ± 1,20	79,01 ± 0,67	77,90 ± 1,92 *	<0,05

Tabla 22. Análisis del perfil de lípidos en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Los lípidos a nivel hepático (Tabla 23) mostraron un aumento significativo en el porcentaje de triglicéridos en ratones db/db, respecto a los ratones no diabéticos. Sin embargo, en los ratones db/db_{cat} no se detectaron cambios en el perfil de lípidos hepáticos.

Lípidos en Hígado	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
% Esteres de Colesterol	2,83 ± 0,24	7,35 ± 3,02	2,07 ± 0,25	0,19
% Colesterol libre	10,08 ± 1,04	6,43 ± 1,56	6,16 ± 1,21	0,12
% Triglicéridos	13,43 ± 4,72	64,38 ± 11,32 *	48,41 ± 7,04	<0,05
% Fosfolípidos	72,55 ± 3,99	22,18 ± 10,82 *	43,36 ± 5,76	<0,05

Tabla 23. Análisis del perfil de lípidos en hígado de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+.

4.1.2b Evaluación de los niveles de lípidos en miocardio e hígado por nefelometría en ratones diabéticos

De tal manera a medir la acumulación de lípidos en los modelos animales de DM2 por una técnica alternativa, se procedió a la determinación de estas especies en hígado y miocardio posterior a su extracción lipídica.

Lípidos en tejidos	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
Hígado				
Colesterol (μmol/mg)	0,010 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,004 ± 0,000 *	<0,05
Triglicéridos (μmol/mg)	0,031 ± 0,002	0,097 ± 0,010 *	0,043 ± 0,007 †	<0,05
AGL (μmol/mg)	0,048 ± 0,029	0,062 ± 0,002 *	0,055 ± 0,004	<0,05
Miocardio				
Colesterol (μmol/mg)	0,059 ± 0,004	0,095 ± 0,006	0,102 ± 0,007 *	<0,05
Triglicéridos (μmol/mg)	0,189 ± 0,012	0,294 ± 0,158	0,162 ± 0,005	0,44
AGL (μmol/mg)	0,232 ± 0,018	0,460 ± 0,040 *	0,283 ± 0,029	<0,05

Tabla 24. Lípidos medidos mediante nefelometría en hígado y miocardio de los ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5-10 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad, los datos se relativizaron a la concentración de proteínas de los tejidos. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba posterior de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo de control. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+; †p<0,05 frente al grupo db/db. Abreviaturas: AGL, ácidos grasos libres.

Se observó que el modelo de db/db cursó con niveles hepáticos significativamente elevados de triglicéridos (~3,13 veces; p<0,05) y AGL (~1,29 veces; p<0,05) respecto a los no diabéticos. Consecuentemente la concentración de ácidos grasos libres en el miocardio también se vio incrementada (~1,98 veces; p<0,05) en este modelo animal.

Por otro lado, el modelo de diabetes más avanzada, los db/db_{cat}, como era de esperar exhibió un perfil diferente a los db/db. En este caso, los ratones db/db_{cat} mostraron en hígado una disminución significativa en los niveles de colesterol (~60%; p<0,05) respecto a los no diabéticos, además de triglicéridos disminuidos en comparación con sus congéneres db/db (~55%; p<0,05). En miocardio de estos animales se detectaron niveles significativamente aumentados de colesterol (~1,73 veces; p<0,05) respecto a los db/+.

4.1.2c Evaluación de los niveles de ceramidas circulantes en plasma, en las fracciones de HDL y no-HDL, en miocardio e hígado mediante Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

Ratones obesos

Los niveles plasmáticos de esfingolípidos se muestran en la Tabla 25. En los ratones obesos no se observaron cambios significativos en el perfil de ceramidas circulantes, ni en las relaciones entre ceramidas. A pesar de ello la Cer 20:0 exhibió una tendencia a estar aumentada en plasma de ratones obesos, en comparación con ratones no obesos. La esfingomielina total no exhibió diferencias entre grupos.

Esfingolípidos en Plasma (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Cer 18:0	1.906 ± 217	2.782 ± 611	0,25
Cer 20:0	3.477 ± 609	5.774 ± 280	0,07
Cer 22:0	81.723 ± 15.382	84.365 ± 8.811	>0,99
Cer 24:0	143.742 ± 27.008	102.514 ± 5.400	0,57
Cer 24:1	110.119 ± 15.801	82.792 ± 4.736	0,57
Cer total	340.968 ± 57.826	278.227 ± 17.805	0,78
Cer 18:0/Cer 24:0	0,010 ± 0,001	0,015 ± 0,003	0,18
Cer 24:1/Cer 24:0	0,603 ± 0,086	0,453 ± 0,026	0,57
Esfingomielina total	34.606.247 ± 5.761.521	38.058.953 ± 2.933.922	>0,99

Tabla 25. Análisis de los niveles de esfingolípidos circulantes en plasma de ratones no obesos y obesos

Los datos se relativizaron respecto al volumen de plasma empleado V=50µL. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05. Abreviaturas: Cer (ceramidas).

Los niveles relativos de ceramidas medidas en la fracción de HDL en ratones obesos no difirió de la descrita en el grupo no obeso, a excepción

de la disminución significativa en la ceramida Cer 24:1 (~57%; p<0,05)

Tabla 26.

Ceramidas en HDL (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Cer 16:0	2.868 ± 347	2.282 ± 552	0,41
Cer 18:0	1.071 ± 195	1.060 ± 334	0,73
Cer 20:0	2.218 ± 621	2.099 ± 367	0,73
Cer 22:0	31.226 ± 2.810	16.187 ± 1.244	0,06
Cer 24:0	40.396 ± 4.784	14.113 ± 1.188	0,06
Cer 24:1	32.024 ± 4.118	13.874 ± 1.810 *	<0,05
Cer total	78.808 ± 6.779	35.588 ± 1.276	0,06

Tabla 26. Análisis de los niveles de ceramidas circulantes en la fracción HDL de ratones no obesos y obesos

Los datos se relativizaron respecto a la proteína medida en la fracción HDL. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05. En concreto, *p<0,05 frente al grupo no obeso.

Abreviaturas: Cer (ceramidas).

En las ceramidas circulantes en la fracción de no-HDL (Tabla 27) no se alcanzaron cambios significativos en los ratones obesos respecto a los no obesos.

Ceramidas en no-HDL (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Cer 16:0	19.294 ± 3.761	25.115 ± 9.047	0,69
Cer 18:0	6.987 ± 2.031	10.392 ± 6.976	0,80
Cer 20:0	9.059 ± 1.975	15.360 ± 7.876	0,69
Cer 22:0	84.074 ± 9.585	121.116 ± 47.890	>0,99
Cer 24:0	155.793 ± 19.399	153.302 ± 61.642	0,28
Cer 24:1	69.634 ± 6.282	67.568 ± 23.400	0,28
Cer total	336.758 ± 37.174	386.617 ± 152.677	0,41

Tabla 27. Análisis de los niveles de ceramidas circulantes en la fracción no-HDL de ratones no obesos y obesos

Los datos se relativizaron respecto a la proteína medida en la fracción no-HDL. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de

edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Abreviaturas: Cer (ceramidas).

El perfil de esfingolípidos en miocardios de ratones obesos (Tabla 28) mostró un incremento significativo en el contenido relativo de la ceramida Cer 18:0 (~2,15 veces; $p < 0,05$) y tendencias a la baja en el caso de las ceramidas de cadena muy larga Cer 24:0 y Cer 24:1, respectivamente. No se detectaron cambios significativos en la esfingomielina total en ese tejido.

Esfingolípidos en miocardio (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Cer 16:0	7.628 ± 845	12.193 ± 4.766	>0,99
Cer 18:0	16.822 ± 1.371	36.176 ± 5.576 *	<0,05
Cer 20:0	71.157 ± 10.419	78.258 ± 18.263	>0,99
Cer 22:0	157.164 ± 31.769	324.587 ± 70.893	0,06
Cer 24:0	204.363 ± 59.378	91.755 ± 23.636	0,07
Cer 24:1	203.702 ± 53.359	88.275 ± 22.937	0,07
Cer total	456.207 ± 97.056	499.101 ± 118.504	0,90
Esfingomielina total	97.215.450 ± 23.133.231	62.651.940 ± 8.080.567	0,22

Tabla 28. Análisis de los niveles de esfingolípidos en miocardio de ratones no obesos y obesos

Los datos se relativizaron por el peso del tejido. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso. Abreviaturas: Cer (ceramidas).

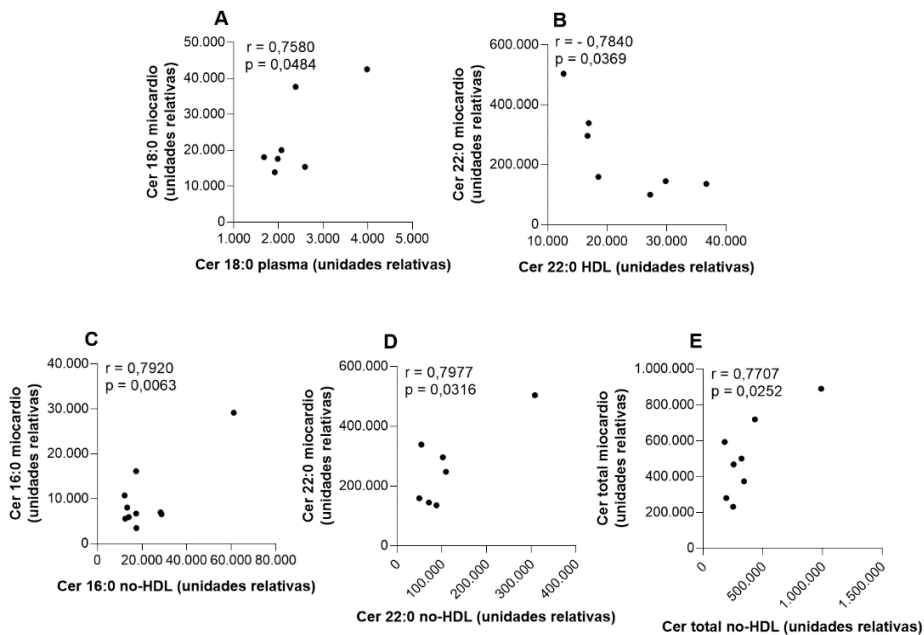


Figura 15. Relación de los niveles de ceramidas en plasma, fracción de HDL; no-HDL y miocardio de ratones no obesos y obesos

Correlación directa entre los niveles de Cer 18:0 en plasma (A); relación inversa de la Cer 22:0 en la fracción de HDL (B); relación directa de la Cer 16:0, Cer 22:0 y Cer total en la fracción de no-HDL y el miocardio de ratones obesos y no obesos (n=7-10). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados. Abreviatura: Cer (ceramida).

En la Figura 15 se presentan las correlaciones entre especies de ceramidas en circulación y en miocardio de animales obesos. La especie Cer 18:0 plasmática se relacionó directamente con la medida en miocardio (Figura 15:A). En el caso de la Cer 22:0 circulante en la fracción de HDL, se destaca la relación inversamente proporcional con la depositada en miocardio de estos mismos animales (Figura 15: B). Y finalmente, observamos relaciones directas entre el contenido de las Cer 16:0; Cer 22:0 y el total de ceramidas circulantes en la fracción de no-HDL (Figura 15:C, D y E) con las correspondientes de miocardio en estos ratones.

El contenido relativo de ceramidas, así como la esfingomielina total hepáticas no mostraron cambios significativos en el modelo de prediabetes (Tabla 29). Sin embargo, los niveles relativos de Cer 24:1 se encontraron

marginalmente disminuidos (~41%; $p=0,06$) en hígado de ratones obesos. Por otro lado, los niveles disminuidos de Cer 24:0 y Cer 24:1 a nivel hepático en el grupo de ratones obesos se relacionaron directamente con las medidas en miocardio de estos animales (Figura 16).

Esfingolípidos en hígado (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Cer 16:0	14.182 ± 2.552	13.168 ± 1.646	>0,99
Cer 18:0	9.267 ± 1.254	9.434 ± 1.442	>0,99
Cer 20:0	16.233 ± 1.566	19.733 ± 2.775	0,34
Cer 22:0	285.301 ± 26.781	249.720 ± 44.893	0,68
Cer 24:0	468.498 ± 98.936	254.509 ± 49.780	0,11
Cer 24:1	271.928 ± 37.667	161.649 ± 19.906	0,06
Cer total	1.032.567 ± 141.446	708.212 ± 117.930	0,20
Esfingolmielina total	118.462.909 ± 14.104.875	119.450.953 ± 15.852.207	0,90

Tabla 29. Análisis de los niveles de ceramidas en hígado de ratones no obesos y obesos

Los datos se relativizaron por el peso del tejido. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media ($n=5$ ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p<0,05$. Abreviatura: Cer (ceramida).

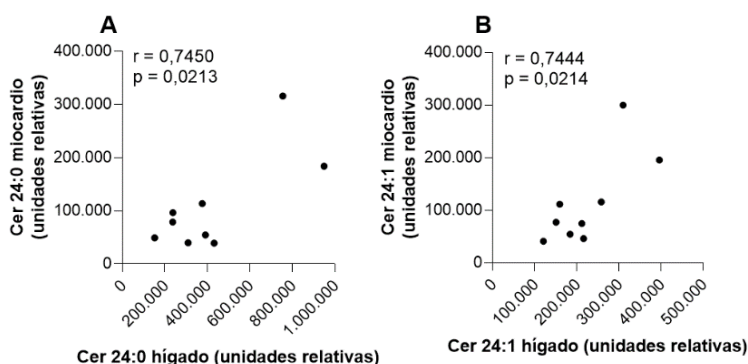


Figura 16. Relación de los niveles de Cer 24:0 y Cer 24:1 en hígado y miocardio de ratones no obesos y obesos

Correlación directa entre las especies de ceramidas Cer 24:0 y Cer 24:1 a nivel hepático y el miocardio ratones no obesos y obesos ($n=9$). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados. Abreviatura: Cer (ceramida).

Ratones diabéticos

También se determinaron los niveles relativos de diferentes especies esfingolípídicas en los modelos animales de DM2. A continuación se describen los datos más relevantes.

En el plasma de los ratones db/db se encontraron significativamente incrementados los niveles de ceramidas de cadena larga Cer 18:0 (~4,33 veces; $p < 0,05$) y Cer 20:0 (~3,00 veces; $p < 0,05$), así como la relación entre Cer 18:0/Cer 24:0 (~5,30 veces; $p < 0,05$), respecto al no diabético (Figura 17). Por otra parte, el perfil plasmático de ceramidas en ratones db/db_{cat} mostró un aumento en las mismas especies que sus congéneres db/db (Cer 18:0; ~5,43 veces $p < 0,05$ y Cer 20:0; ~2,96 veces $p < 0,05$; respectivamente). Todo esto acompañado de un incremento significativo en la relación Cer 18:0/Cer 24:0 (~6,50 veces; $p < 0,05$) en comparación con el grupo db/+ y sin suponer cambios significativos entre ambos modelos de diabetes.

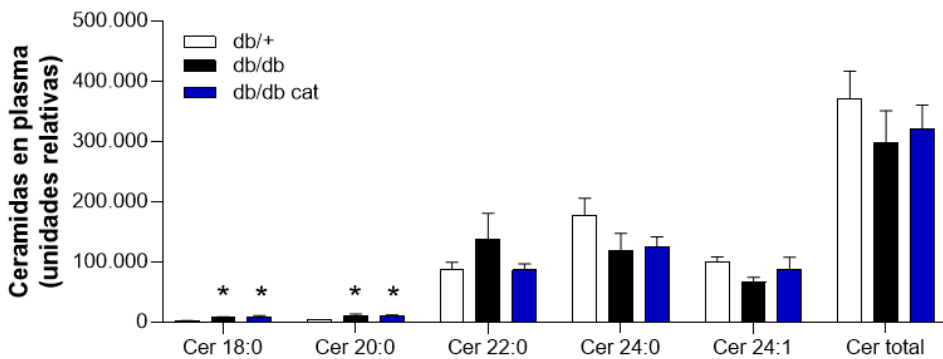


Figura 17. Análisis de los niveles de esfingolípidos circulantes en plasma de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los datos se relativizaron por el volumen de plasma empleado $V=50\mu\text{L}$. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media ($n=5$ ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+. Abreviatura: Cer (ceramida).

Las ceramidas en la fracción de HDL se presentan en la Figura 18. En los ratones db/db se observó una disminución significativa de la ceramida Cer 24:1 (~39%; $p < 0,05$). En el modelo de ratones db/db_{cat} se observaron aumentos en los niveles de las ceramidas Cer 16:0 (~1,98 veces; $p < 0,05$) y Cer 18:0 (~1,98 veces; $p < 0,05$), estando estos acompañados de una disminución significativa en los niveles de ceramida Cer 24:1 (~30%; $p < 0,05$), en comparación con los ratones del grupo db/+. Entre los dos modelos de diabetes estudiados no se registraron cambios significativos.

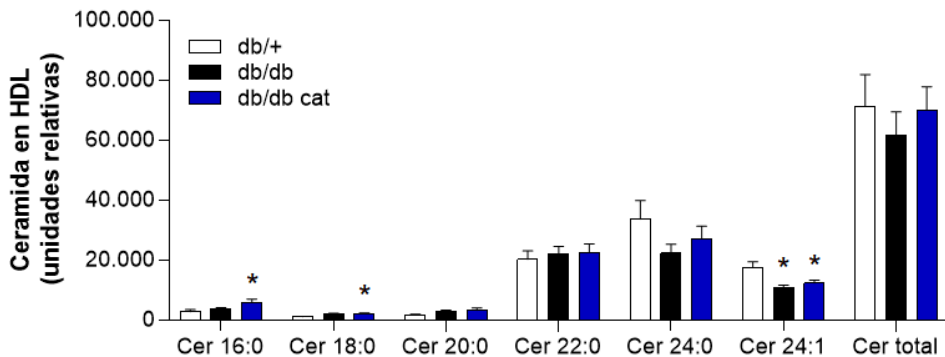


Figura 18. Perfil de ceramidas circulantes en la fracción de HDL de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los datos se relativizaron por la medición de proteína de la fracción HDL. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media ($n=5$ ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+. Abreviatura: Cer (ceramida).

El análisis de ceramidas circulantes en la fracción no-HDL de ambos modelos diabéticos se representa en la figura 19. La ceramida Cer 24:0 se encontró significativamente disminuida en el modelo db/db (~53%; $p < 0,05$) respecto al grupo de animales no diabéticos. En cuanto a los db/db_{cat}, exhibieron una disminución importante en los niveles de las ceramidas Cer 22:0 (~69%; $p < 0,05$) y Cer 24:0 (~66%; $p < 0,05$), resultando en la disminución significativa de las ceramidas totales (~57%; $p < 0,05$), en comparación con los db/+.

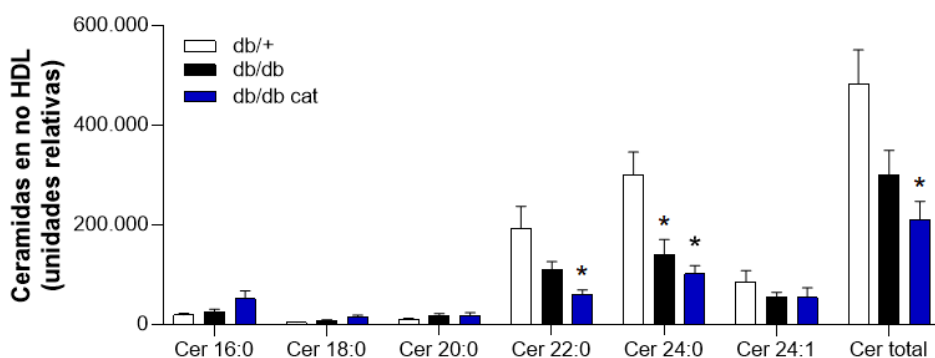


Figura 19. Perfil de ceramidas circulantes en la fracción de no-HDL de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los datos se relativizaron por la medición de proteína de la fracción no-HDL. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+. Abreviatura: Cer (ceramida).

Exploramos además la abundancia relativa de estas especies esfingolípídicas en miocardio y se observó que el modelo db/db cursó con una disminución significativa en la ceramida Cer 24:0 (~53%; $p < 0,05$) respecto al grupo db/+ (Tabla 30). Por su parte, los ratones db/db_{cat} también exhibieron una disminución importante en los niveles de Cer 24:0 (~65%; $p < 0,05$) y además de la ceramida Cer 24:1 (~73%; $p < 0,05$), todo esto acompañado de la disminución significativa de las ceramidas totales en este tejido (~58%; $p < 0,05$), en comparación con los ratones no diabéticos. En cuanto a los niveles de esfingomielina total no se presentaron cambios entre los grupos con DM2.

Esfingolípidos en miocardio (unidades relativas)	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
Cer 16:0	8.983 ± 1.486	9.540 ± 1.595	13.583 ± 4.385	0,48
Cer 18:0	27.111 ± 3.072	49.291 ± 10.944	39.141 ± 3.695	0,12
Cer 20:0	133.242 ± 23.848	139.529 ± 32.756	66.892 ± 4.880	0,09
Cer 22:0	305.720 ± 49.471	256.618 ± 41.033	152.116 ± 18.686	0,07
Cer 24:0	237.294 ± 20.297	111.989 ± 16.172 *	83.342 ± 13.726 *	<0,05
Cer 24:1	207.896 ± 31.981	148.715 ± 35.041	56.075 ± 7.588 *	<0,05
Cer total	977.853 ± 111.390	715.682 ± 116.953	408.154 ± 43.613 *	<0,05
Esfingomielina total	117.870.697 ± 20.773.404	113.120.172 ± 17.093.004	89.859.525 ± 22.535.756	0,58

Tabla 30. Análisis de esfingolípidos en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los datos se relativizaron por el peso de tejido empleado. Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+. Abreviatura: Cer (ceramida).

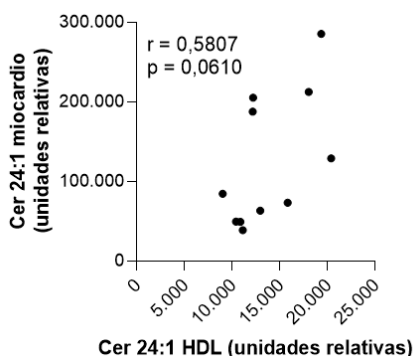


Figura 20. Relación de los niveles de Cer 24:1 en la fracción HDL y miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Correlación directa entre los niveles de Cer 24:1 en la fracción de HDL y miocardio de los modelos diabéticos (n=11). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados. Abreviatura: Cer (ceramida).

En concordancia con estos hallazgos, se destacó la relación directa entre los niveles circulantes de Cer 24:1 en la fracción de HDL y la que se determinó en miocardio de los animales en estudio (Figura 21).

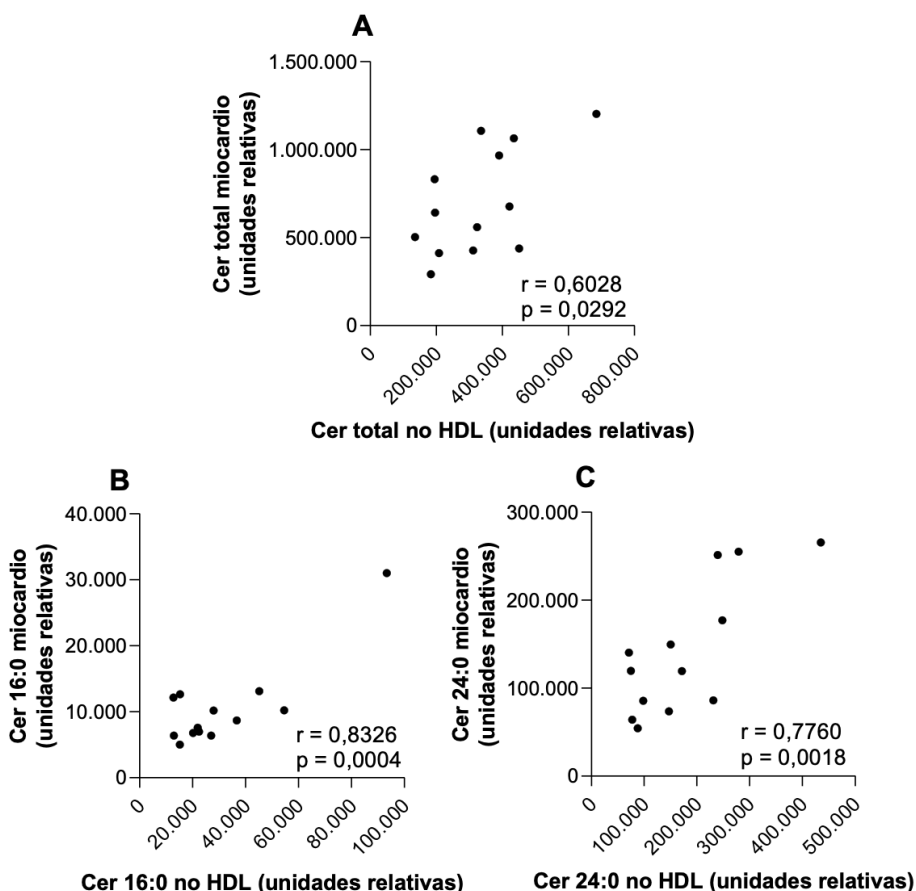


Figura 21. Relación de los niveles de ceramidas en la fracción de no-HDL y miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Correlación directa entre los niveles de ceramidas en la fracción no-HDL; Cer total (A), Cer 16:0 (B) y Cer 24:0 (C) y miocardio de los modelos diabéticos (n=13). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados. Abreviatura: Cer (ceramida).

Por otro lado, el nivel de las ceramidas totales circulantes en la fracción de no-HDL se relacionó directamente con las medidas en miocardio (Figura 21: A). Además, se comprobó la existencia de una relación directa entre las especies de ceramidas Cer 16:0 (Figura 21: B) y Cer 24:0 (Figura 21: C) circulantes y las depositadas en miocardio de los ratones db/db y los db/db_{cat}.

También se determinaron los niveles de esfingolípidos en el hígado de ambos modelos animales de diabetes (Tabla 31). En general no se

observaron diferencias significativas en el grupo db/db. Sin embargo, en el grupo db/db_{cat} se presentó una importante disminución de los niveles de la ceramida Cer 22:0 (~56%; p<0,05) respecto a los no diabéticos, así como también en comparación al modelo db/db (~62%; p<0,05). Este modelo mostró niveles significativamente disminuidos de esfingomielina (~50%; p<0,05), respecto al grupo db/+.

Esfingolípidos en hígado (unidades relativas)	db/+	db/db	db/db_{cat}	P
Cer 16:0	19.334 ± 2.817	19.509 ± 2.711	22.660 ± 4.290	0,74
Cer 18:0	13.022 ± 1.883	37.554 ± 17.932	29.326 ± 7.473	0,33
Cer 20:0	23.126 ± 3.043	43.790 ± 14.281	23.096 ± 3.883	0,20
Cer 22:0	434.900 ± 83.142	500.556 ± 74.384	189.281 ± 23.123 * †	<0,05
Cer 24:0	787.961 ± 173.082	466.660 ± 93.536	345.735 ± 86.694	0,09
Cer 24:1	355.748 ± 61.814	378.389 ± 119.727	153.295 ± 44.033	0,14
Cer total	1.634.090 ± 321.136	1.395.821 ± 301.070	707.541 ± 148.591	0,08
Esfingomielina total	168.737.850 ± 21.521.386	148.799.738 ± 22.090.749	85.128.497 ± 14.368.268 *	<0,05

Tabla 31. Análisis de esfingolípidos en hígado de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los datos en bruto se relativizaron por el peso de tejido empleado. Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+; † p<0,05 frente al grupo db/db. Abreviatura: Cer (ceramida).

Se destaca que, aunque los niveles relativos de la ceramida Cer 18:0 no exhibieron cambios significativos en hígado comparado con los ratones db/+, sí se relacionó de manera directa con los niveles relativos circulantes para esta especie de ceramida (Figura 22).

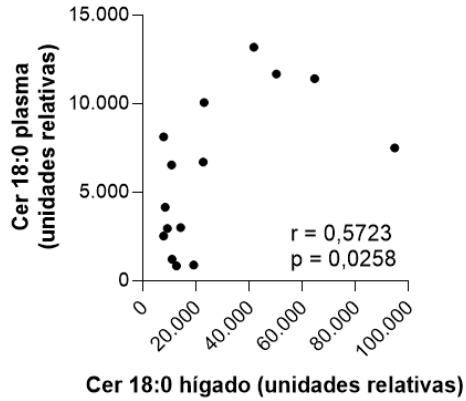


Figura 22. Relación de los niveles de Cer 18:0 en hígado y plasma de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}
 Correlación directa entre Cer 18:0 a nivel hepático y la circulante en plasma de los modelos diabéticos (n=15). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados. Abreviatura: Cer (ceramida).

4.1.3 Evaluación de la captación de LDL "in vitro" e "in vivo"

4.1.3a Análisis de esteatosis inducida en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2

Análisis de la citotoxicidad celular inducida por PA y OA en condiciones mimetizantes de DM2

Con el fin de explorar la posible contribución de las LDL modificadas sobre la acumulación de lípidos en cardiomiocitos, se emplearon cultivos celulares de cardiomiocitos ventriculares humanos AC16.

En primer lugar, estas células fueron expuestas a diferentes concentraciones crecientes de glucosa y ácidos grasos durante 24 h, para determinar el efecto citotóxico por parte del PA y una mezcla de ácidos grasos PA/OA, suplementados como parte de las condiciones experimentales que simulan DM2. Los datos mostraron que la viabilidad de los cardiomiocitos AC16 disminuyó a concentraciones crecientes de PA de forma independiente de la concentración de glucosa empleada (i.e., siendo la concentración de glucosa no elevada igual a 5,5 mM y la elevada igual a 25 mM) (Figura 23: A).

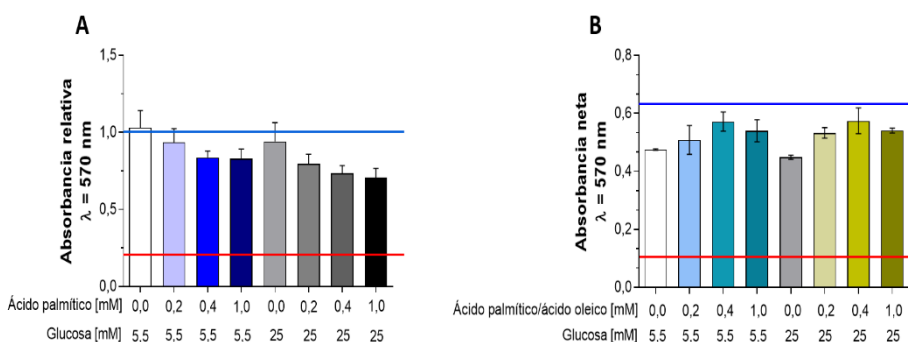


Figura 23. Citotoxicidad celular en cardiomiocitos AC16 expuestos a condiciones miméticas de DM2

La línea azul representa la condición en la que se alcanza mayor viabilidad (control positivo de viabilidad en el ensayo: medio DMEM-F12 ham completo), mientras que la línea roja indica la condición en la que se mide mortalidad celular. Los valores se representan como la media \pm SEM de n=3 experimentos independientes.

La viabilidad de cardiomiocitos en cultivo expuestos a la combinación en proporciones equimolares de los ácidos grasos PA/OA fue en general y a igual concentración final de ácidos grasos, superior a la mostrada cuando estas células se incubaron sólo con PA (Figura 23: B).

Así, la viabilidad medida en cardiomiocitos AC16 expuestos a concentraciones crecientes de la mezcla equimolar de PA/OA no se vio alterada, tanto en las condiciones con niveles basales como elevados de glucosa.

Análisis de esteatosis inducida por la mezcla equimolar de PA/OA en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2

Teniendo en cuenta la prueba de citotoxicidad celular, para demostrar la entrada de ácidos grasos y su acumulación en cardiomiocitos se escogió trabajar con la mezcla de ácidos grasos, en presencia/ausencia de niveles elevados de glucosa y evaluar la acumulación de vesículas lipídicas en los cardiomiocitos mediante su tinción con ORO.

En la Figura 24, se presentan micrografías de los cardiomiocitos expuestos a las diferentes condiciones de trabajo. Se observó que, en la condición basal (glucosa 5,5 mM) las células presentaron una morfología normal, sin acúmulo de vesículas lipídicas (Figura 24: A). En cambio, al aumentar la concentración final de glucosa en el medio hasta 25 mM, se evidenció la presencia de vesículas lipídicas en el citoplasma de las células (Figura 24: B).

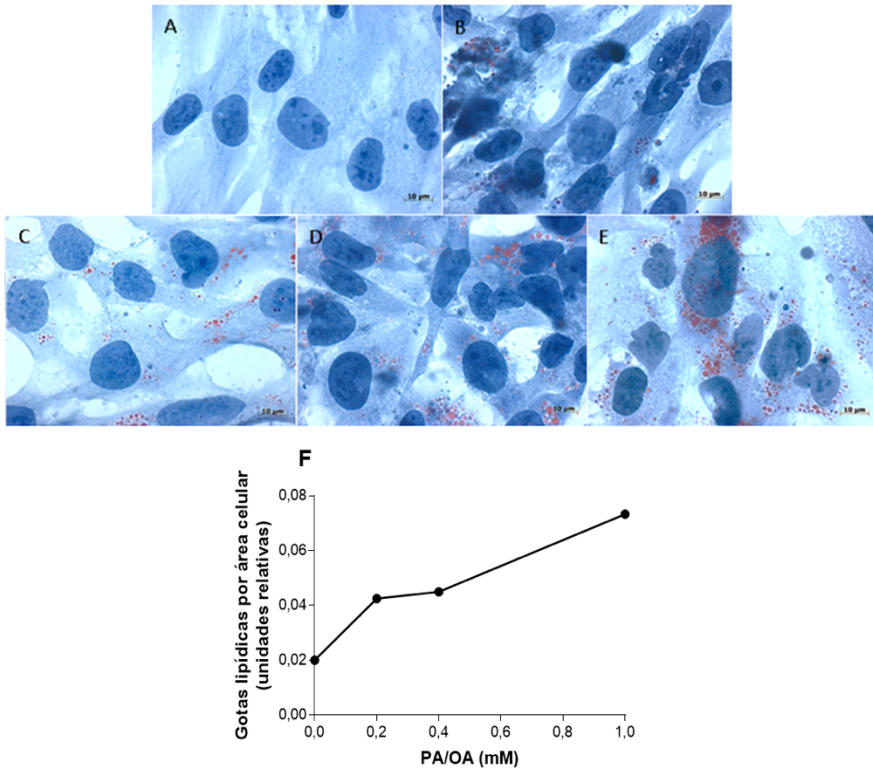


Figura 24. Micrografías representativas de cultivos de cardiomiocitos AC16 expuestas a diferentes condiciones miméticas de DM2

Los cultivos celulares fueron fijados con formalina, posteados con ORO para revelar las vesículas lipídicas y contrateñidos con hematoxilina para resaltar los núcleos celulares. Se muestra la escala de 10 μ m en cada panel. A: Glc 5,5 mM; B: Glc 25 mM; C: Glc 25 mM + PA/OA 0,2 mM; D: Glc 25 mM + PA/OA 0,4 mM; E: Glc 25 mM + PA/OA 1,0 mM; F: Vesículas lipídicas por área celular.

Los datos cualitativos y cuantitativos mostraron un aumento en la acumulación de lípidos intracelulares en los cardiomiocitos expuestos a condiciones que simulan la DM2, lo que reveló la esteatosis inducida por el PA/OA en estas células (Figura 24: C, D, E y F).

Análisis de esteatosis inducida por LDLox en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2

A continuación se evaluó si la acumulación de lípidos intracelulares se vio inducida por la presencia de las LDLox, en los cardiomiocitos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2.

En la Figura 25 se muestran micrografías representativas de las células AC16 en presencia/ausencia de diferentes concentraciones no citotóxicas de LDLox. La acumulación de lípidos aumentó proporcionalmente en presencia de concentraciones crecientes LDLox (i.e., 300 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fijadas previamente por pruebas de citotoxicidad celular, datos no mostrados) (Figura 25).

Dicho aumento se observó tanto en el número, como en el tamaño de las vesículas intracelulares (Figura 26).

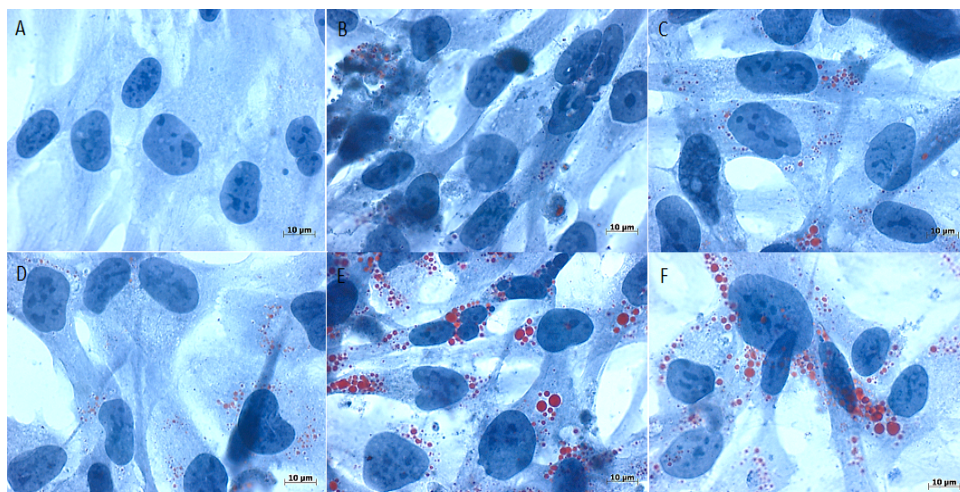


Figura 25. Micrografías representativas de cultivos de cardiomiocitos AC16 expuestos a condiciones miméticas de DM2 en presencia de LDLox

Los cultivos celulares fueron fijados con formalina, posteados con ORO para revelar las vesículas lipídicas y contrateñidos con hematoxilina para resaltar los núcleos celulares. Se muestra la escala de 10 μm en cada panel. A: Glc 5,5 mM; B: Glc 25 mM; C: Glc 5,5 mM + LDLox 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: Glc 5,5 mM + LDLox 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: Glc 25 mM + PA/OA 0,4 mM + LDLox 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y F: Glc 25 mM + PA/OA 0,4 mM + LDLox 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En conjunto estos datos demuestran que la exposición de LDLox, en la condición mimetizante de DM2, indujo la acumulación de vesículas lipídicas; revelando de esta manera la contribución de estas lipoproteínas modificadas al fenotipo esteatótico.

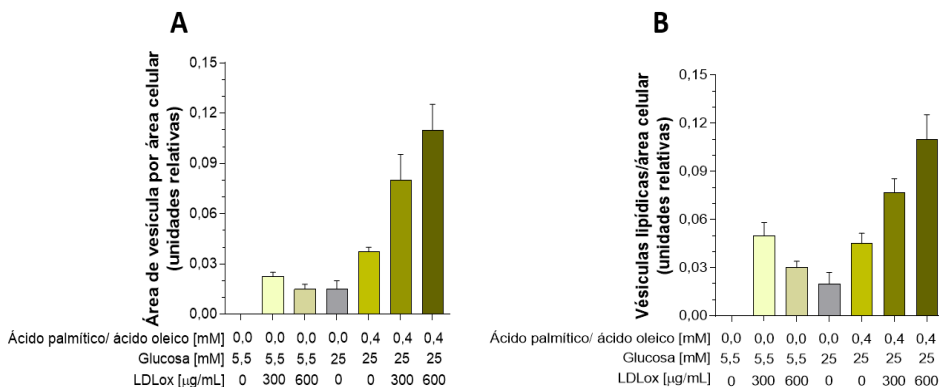


Figura 26. Cuantificación de lípidos celulares en cardiomiocitos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2 en ausencia/presencia de LDLox

A) área de vesículas lipídicas por área celular. B) número de vesículas lipídicas por área celular. Los valores se representan como la media \pm SEM de 10 campos aleatorios no solapados de un experimento.

4.1.3b Evaluación de la captación de LDLnat y LDLox en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2

La acumulación de lípidos intracelulares observada en el apartado anterior puede deberse a un aumento en la captación selectiva de estas lipoproteínas por parte de receptores específicos. Se evaluó la contribución de los receptores candidatos a través de su inhibición funcional, utilizando moléculas inhibitoras de la acción del LDLR y de la LRP1, implicados en la captación de LDL y de LDL agregadas, respectivamente, y del receptor CD36, un receptor con capacidad de internalizar ácidos grasos y también involucrado en la captación de LDLox en las células. Para ello, se emplearon LDLox previamente marcadas con el fluorocromo lipofílico Dil (LDLox-Dil) y su captación se comparó con las LDLnat (no modificadas) (LDLnat-Dil) utilizadas como referencia y marcadas con el mismo fluorocromo. Las células fueron expuestas a las

mismas concentraciones de lipoproteínas, tanto LDLnat-Dil como LDLox-Dil (50 µg/mL, fijadas previamente por pruebas piloto, datos no mostrados) durante 24 h.

Se evaluaron los diferentes inhibidores funcionales de LDLnat y LDLox. La captación tanto de LDLnat-Dil como de LDLox-Dil, quedó bloqueada en presencia de RAP (87% y 73%, respectivamente, figura 27). RAP actúa inhibiendo la función de LDLR y LRP1, por lo que esto último impidió poder discernir entre cuál de ellos predominaba en la captación de una u otro tipo de LDL por parte de los cardiomiocitos. Sin embargo, estos datos demostraron su papel en la captación de ambos tipos de LDL.

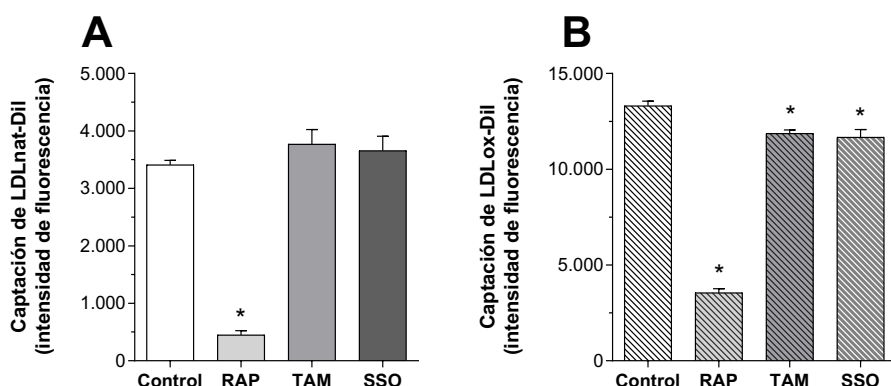


Figura 27. Representación de la captación de LDLnat-Dil y LDLox-Dil marcadas con fluorocromo Dil por parte de los cardiomiocitos AC16 en condiciones miméticas de DM2

A) Captación de LDLnat-Dil (50µg/mL) tras 24 h de exposición en presencia de inhibidores. B) Captación de LDLox-Dil (50µg/mL) tras 24 h de exposición en presencia de inhibidores. Abreviaturas: LDLnat-Dil, LDL nativa marcada con fluorocromo Dil; LDLox-Dil, LDL oxidada marcada con fluorocromo Dil; RAP, proteína asociada al receptor (1 µM); SSO, sulfo-N-succinimidil oleato 1 µM (inhibidor de la acción de CD36); TAM, tamoxifeno 1 µM (inhibidor de la expresión de CD36). Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=3 experimentos independientes). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo control. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo control (sin inhibidores).

Por otro lado, la adición de TAM y de SSO, inhibidores de la acción de CD36, no promovió ningún efecto en la captación de LDLnat-Dil por parte

de los cardiomiocitos AC16 (Figura 27: A). En cambio, estos compuestos inhibieron significativamente (11% y 13%, respectivamente, Figura 27: B) la captación de LDLox-Dil por parte de cardiomiocitos. En conjunto, estos datos sugieren que además de la acción de LDLR/LRP1, CD36 también interviene en la captación de las LDLox por cardiomiocitos en cultivo.

4.1.3c Evaluación de la captación de LDLnat y LDLox en un modelo en ratones db/db

Análisis del metabolismo de LDLnat y LDLox en un modelo animal de DM2

Seguidamente se planteó evaluar la cinética metabólica y la captación por parte del miocardio de LDLox. Para esta prueba se utilizaron LDL humanas como alternativa a las no-HDL de ratón. El motivo de esta elección fue porque la fracción no-HDL representa una fracción lipoproteica minoritaria del total de lipoproteínas circulantes en ratones, dificultando de este modo la obtención de cantidades suficientes para su estudio. Por otro lado, el estudio del metabolismo de LDL solo pudo ser abordado en ratones db/db.

Las cinéticas de aclaramiento y captación por órganos diana se compararon con las mostradas por las LDLnat. Tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos estas lipoproteínas fueron marcadas con un fluorocromo (Dil) que se une ávidamente a los lípidos y permite trazar las partículas en los diferentes compartimentos plasmáticos/tisulares en el modelo animal empleado.

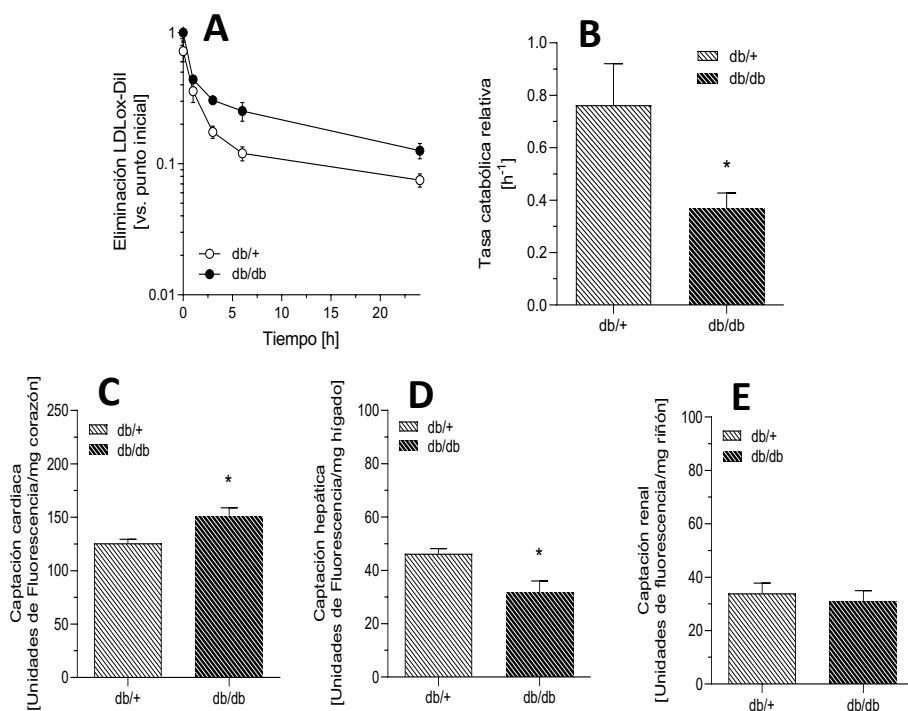


Figura 28. Representación gráfica de cinética de LDLox-Dil en ratones db/+ y diabéticos db/db

A) Cinéticas de aclaramiento de LDLox-Dil tras 24 h de la inyección vía vena de la cola en ratones db/+ y diabéticos db/db. B) Tasa catabólica relativa de LDLox-Dil. C) Captación de LDLox-Dil en miocardio. D) Captación de LDLox-Dil en hígado. E) Captación de LDLox-Dil en riñones. Abreviatura: LDLox-Dil, LDL oxidada marcada con fluorocromo Dil. Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron mediante la prueba t de Mann-Whitney (n=5 ratones por grupo), las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Se observó que los ratones db/db presentaron una tasa de aclaramiento de LDLox-Dil claramente reducida en comparación con la de los ratones no diabéticos (Figura 28: A y B). Esto último se debió fundamentalmente a una captación disminuida (50%; $p < 0,05$) de estas lipoproteínas por parte del hígado, principal responsable en su retirada (Figura 28: D). El análisis de otros tejidos reveló que el miocardio de ratones db/db mostró más avidez en la captación de las LDLox (20%, $p < 0,05$) (Figura 28: C), no detectándose cambios en la captación en riñón (Figura 28: E).

En contraste, se determinó que el catabolismo de las LDLnat-Dil no difirió entre ambos grupos de animales estudiados (Figura 29).

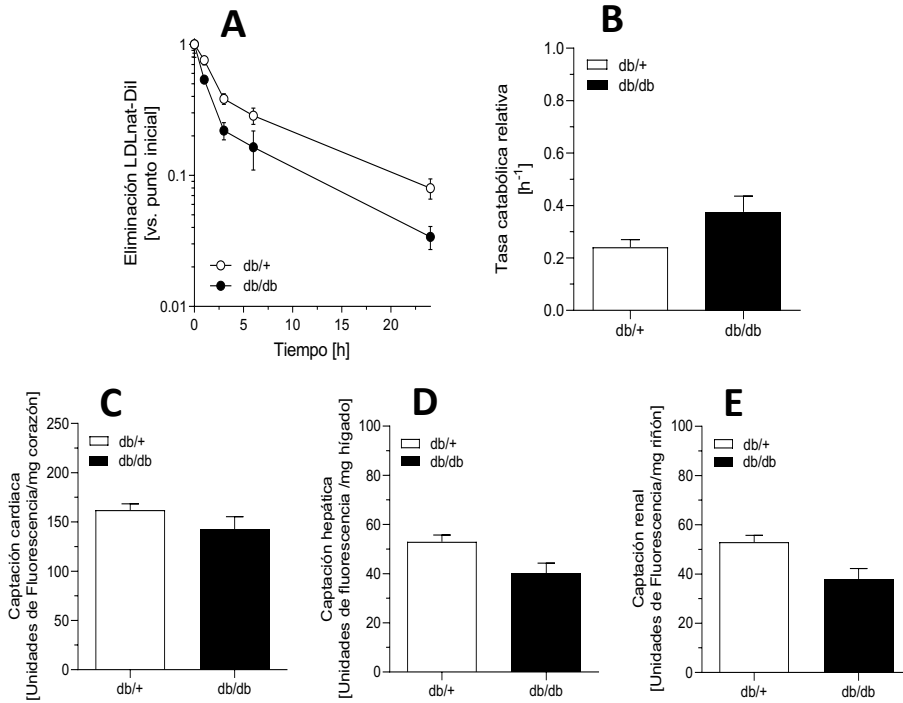


Figura 29. Representación gráfica de cinética de LDLnat-Dil en ratones db/+ y diabéticos db/db

A) Cinéticas de aclaramiento de LDLnat-Dil tras 24 h de la inyección vía vena de la cola en ratones db/+ y diabéticos db/db. B) Tasa catabólica relativa de LDLnat-Dil. C) Captación de LDLnat-Dil en miocardio. D) Captación de LDLnat-Dil en hígado. E) Captación de LDLnat-Dil en riñones. Abreviatura: LDLnat-Dil, LDL nativa marcada con fluorocromo Dil. Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron mediante la prueba t de Mann-Whitney (n=5 ratones por grupo), las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

4.1.3d Análisis de apoptosis inducida por LDLox en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2

La apoptosis es uno de los mecanismos involucrados en remodelado y disfunción cardíaca. Sin embargo, la contribución de las LDLox está pobremente estudiada y en cualquier caso el impacto añadido a otros estímulos pro-apoptóticos aún no ha sido evaluado. En este apartado se muestran los resultados del estudio de inducción de apoptosis en cardiomiocitos humanos AC16 en condiciones mimetizantes de DM2 en presencia de LDLox, con el fin de evaluar la contribución de estas al daño celular. Se observó que el porcentaje de células en fase de apoptosis temprana fue menor en la condición con LDLox respecto al control (Figura 30: A y B). Sin embargo, los cardiomiocitos exhibieron un aumento significativo en el porcentaje de células en la fase tardía de apoptosis que luego evoluciona hacia la muerte celular (~2,5 veces; $p < 0,05$).

Estos datos en conjunto pusieron de manifiesto el efecto de las LDLox en un contexto de diabetes. Consecuentemente con este hallazgo, se determinó la existencia de una relación directa entre el porcentaje aumentado de células en estado de apoptosis avanzada y el porcentaje de células muertas (Figura 30:C).

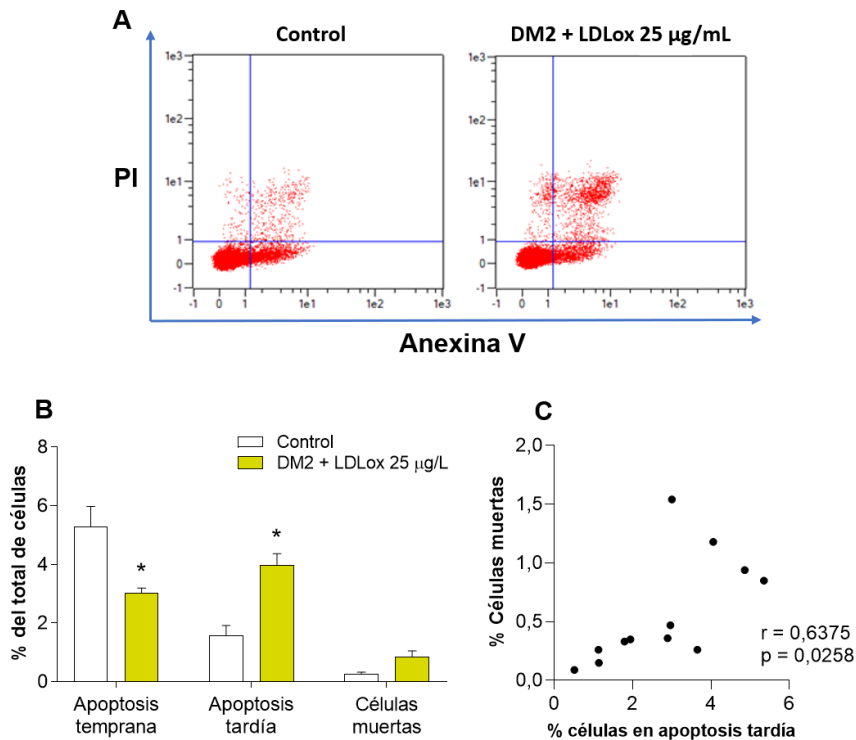


Figura 30. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo en cardiomiocitos AC16 en presencia de LDLox en condiciones miméticas de DM2

A) Imágenes representativas de la citometría de flujo en cardiomiocitos AC16 en presencia del estímulo de DM2 y LDLox 25 µg/mL tras 8 h de exposición. B) Cuantificación de las células en las diferentes fases de apoptosis, temprana y tardía, así como células muertas del % total. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media de ensayos independientes (n=6). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA de dos vías, seguido de post-test de Bonferroni; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo control. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo control. C) Correlación directa entre apoptosis tardía y células muertas (n=6). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados.

4.1.4 Análisis de la expresión génica y niveles de proteínas en miocardio

Ratones obesos

El análisis de la expresión génica y abundancia relativa de proteínas en miocardio de ratones obesos consistió en la exploración de dianas moleculares involucradas en procesos como el daño, la inflamación y estrés de RE en miocardio de estos animales. También se evaluó la expresión relativa de receptores implicados en la captación de lipoproteínas.

En la Tabla 32 se muestran la expresión génica de receptores comprometidos en la captación diferencial de lipoproteínas y de marcadores de daño miocárdico.

Expresión génica (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Receptores lipídicos			
<i>Lrp-1</i>	1,00 ± 0,09	1,54 ± 0,26	0,11
<i>Ldlr</i>	1,00 ± 0,08	1,69 ± 0,18 *	<0,05
<i>Cd36</i>	1,00 ± 0,07	1,30 ± 0,11 *	<0,05
Marcadores de daño miocárdico			
<i>Nppa</i>	1,00 ± 0,12	0,58 ± 0,13 *	<0,05
<i>Nppb</i>	1,00 ± 0,12	1,11 ± 0,20	0,90
<i>Sma</i>	1,00 ± 0,15	1,34 ± 0,24	0,56
<i>Serpine-1</i>	1,00 ± 0,15	1,77 ± 0,46	0,34

Tabla 32. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de receptores lipídicos y marcadores de daño en miocardio de ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso.

Se observó una regulación al alza de los genes de receptores *Ldlr* y *Cd36*, en miocardios de los ratones obesos respecto a los no obesos. Esto último

no se acompañó de cambios significativos en los niveles relativos de RNAm de genes implicados en el daño cardíaco en estos animales, a excepción de la regulación a la baja del gen del péptido natriurético A (*Nppa*) en comparación con el grupo no obeso.

Para comprobar si estos cambios detectados en la expresión génica se traducían en diferencias significativas en la abundancia de proteínas, se llevó a cabo el análisis de Western blot utilizando anticuerpos específicos para las diferentes dianas de interés, en miocardio de los grupos de estudio (Figura 31).

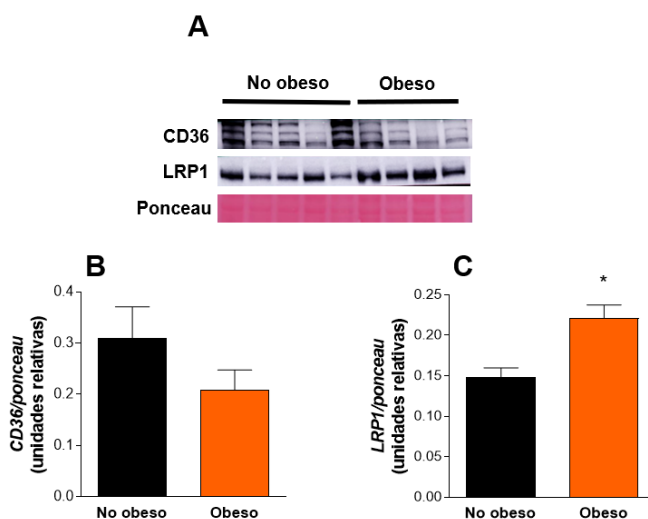


Figura 31. Análisis Western blot de las proteínas CD36 y LRP-1 en miocardio de ratones no obesos y obesos

A) Western blot representativo de las proteínas CD36 y LRP-1. B) Cuantificación de la señal de CD36. C) Cuantificación de la señal de LRP-1. Las señales de las proteínas medidas fueron normalizadas mediante la tinción Ponceau del gel y los datos presentados como media \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). En todos los casos las unidades son relativas a la carga (Ponceau). Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso.

Los datos muestran que, aunque la expresión génica de *Cd36* en miocardio de los ratones obesos se encontró aumentada, no se tradujo en un incremento en su abundancia proteica en dicho tejido (Figura 31: A y B). Por otro lado, a pesar de no detectar cambios en la expresión génica

del receptor *Lrp1* en miocardio, se halló un aumento significativo de la proteína en los obesos en comparación con los no obesos (Figura 31: A y C).

En lo que se refiere a la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en miocardio de estos animales, no se presentaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Tabla 33). Lo mismo ocurrió en el caso de marcadores de estrés de RE, que permanecieron sin cambios en los ratones con obesidad inducida por la dieta rica en grasas.

Expresión génica (unidades relativas)	No obeso	Obeso	P
Inflamación			
<i>Il1b</i>	1,00 ± 0,07	0,81 ± 0,18	0,07
<i>Il6</i>	1,00 ± 0,21	0,89 ± 0,15	0,67
<i>Ccl2</i>	1,00 ± 0,08	0,90 ± 0,14	0,45
<i>Tnf</i>	1,00 ± 0,14	0,71 ± 0,10	0,16
Estrés de RE			
<i>Hspa5</i>	1,00 ± 0,12	1,23 ± 0,17	0,52
<i>Ddit3</i>	1,00 ± 0,05	1,25 ± 0,20	0,60

Tabla 33. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de marcadores de inflamación y estrés de RE en miocardio de ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

En la Figura 32 y Tabla 34 se muestran los marcadores proteicos medidos mediante Western blot en miocardio de estos animales.

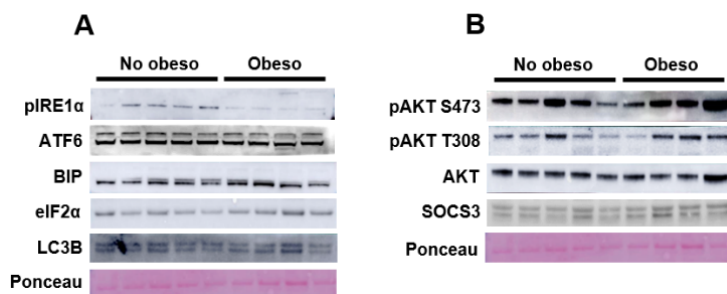


Figura 32. Análisis Western blot de marcadores de estrés de RE, autofagia y resistencia a la insulina en miocardio de ratones no obesos y obesos

A) Western blot representativo de las proteínas implicadas en estrés de RE: pIRE1 α , ATF6, BIP, eIF2 α y autofagia: LC3B. B) Western blot representativo de las proteínas involucradas en resistencia a la insulina: pAKT S473, pAKT T308, AKT y SOCS3. Las señales de las proteínas medidas fueron normalizadas mediante la tinción Ponceau del gel.

Parámetros moleculares	No obeso	Obeso	P
Marcadores de estrés de RE y autofagia			
pIRE1 α	0,55 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	0,11
ATF-6	2,85 \pm 0,08	2,84 \pm 0,08	>0,99
BIP	0,19 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,28
eIF2 α	0,30 \pm 0,02	0,35 \pm 0,03	0,41
LC3B	1,00 \pm 0,04	0,91 \pm 0,01 *	<0,05
Marcadores de resistencia a la insulina			
pAKT308	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,90
pAKT473	0,21 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,90
SOCS3	0,10 \pm 0,002	0,11 \pm 0,002 *	<0,05

Tabla 34. Perfil de marcadores proteicos de estrés de RE, autofagia y resistencia a la insulina analizados por Western blot en miocardio de ratones no obesos y obesos

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). En todos los casos las unidades son relativas a la carga (Ponceau). Todos los parámetros se midieron al final del seguimiento de los ratones, a los 7 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante la prueba t de Mann-Whitney; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo no obeso.

Entre los marcadores de estrés de RE evaluados no se observaron diferencias entre obesos y no obesos (Tabla 34). El marcador de autofagia, en este caso la proteína LC3B, exhibió una disminución significativa en el miocardio de los ratones obesos respecto a los no obesos.

En cuanto a los marcadores de resistencia a la insulina, se destaca el incremento significativo de la proteína SOCS3 (del inglés, *Suppressors Of Cytokine Signaling*) en miocardio de los ratones obesos en comparación con el grupo no obeso (Tabla 34).

Ratones diabéticos

En los modelos de diabetes tanto db/db como db/db_{cat} se evaluaron la expresión génica y el nivel de proteínas de dianas de interés en el tejido miocárdico de los animales.

Expresión génica (unidades relativas)	db/+	db/db	db/db_{cat}	P
Receptores lipídicos				
<i>Lrp1</i>	1,00 ± 0,19	1,19 ± 0,16	1,20 ± 0,21	0,84
<i>Ldlr</i>	1,00 ± 0,25	1,18 ± 0,22	0,96 ± 0,16	0,74
<i>Cd36</i>	1,00 ± 0,13	1,56 ± 0,10 [*]	1,28 ± 0,08	<0,05
Marcadores de daño miocárdico				
<i>Nppa</i>	1,00 ± 0,10	0,70 ± 0,10	1,36 ± 0,27 [†]	<0,05
<i>Nppb</i>	1,00 ± 0,09	0,47 ± 0,06 [*]	0,61 ± 0,07 [*]	<0,05

Tabla 35. Análisis de la expresión génica de receptores lipídicos y marcadores de daño en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=5-8 ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+; † p<0,05 frente al grupo db/db.

En la Tabla 35 se presentan los niveles relativos de expresión de genes de receptores lipídicos y marcadores del daño a nivel del miocardio de estos ratones. Se detectó la regulación al alza del gen *Cd36* en el grupo db/db respecto al no diabético, así como la regulación a la baja del gen *Nppb* en ambos modelos de ratones diabéticos. Los animales db/db_{cat},

además cursaron con un incremento significativo en los niveles de expresión del *Nppa* respecto a sus congéneres del modelo db/db.

En la Tabla 36 se exponen los niveles de expresión génica de marcadores de inflamación y estrés de RE. El modelo db/db no presentó diferencias significativas en los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias evaluadas, respecto a los no diabéticos.

Expresión génica (unidades relativas)	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
Inflamación				
<i>Il1b</i>	1,00 ± 0,06	1,17 ± 0,23	2,79 ± 0,76 * †	<0,05
<i>Il6</i>	1,00 ± 0,16	0,86 ± 0,08	1,61 ± 0,37 †	<0,05
<i>Ccl2</i>	1,00 ± 0,08	0,94 ± 0,08	1,79 ± 0,43	0,35
<i>Tnf</i>	1,00 ± 0,16	0,83 ± 0,15	0,95 ± 0,17	0,81
Estrés de RE				
<i>Ddit3</i>	1,00 ± 0,08	1,24 ± 0,07	1,07 ± 0,11	0,60
<i>Atf4</i>	1,00 ± 0,08	1,24 ± 0,10	2,34 ± 0,30 * †	<0,05
<i>Atf6</i>	1,00 ± 0,12	1,56 ± 0,31	2,83 ± 0,06 * †	<0,05
<i>Xbp1</i>	1,00 ± 0,14	1,42 ± 0,18	2,15 ± 0,23 *	<0,05
<i>Ern1</i>	1,00 ± 0,35	2,65 ± 0,11 *	3,02 ± 0,50 *	<0,05

Tabla 36. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de marcadores de inflamación y estrés de RE en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=5-8 ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+; † p<0,05 frente al grupo db/db.

Sin embargo, el modelo db/db_{cat} cursó con genes regulados al alza de las citoquinas *Il1b* e *Il6* en comparación tanto con los ratones db/+ como con los del modelo db/db.

En lo que se refiere a la expresión génica de dianas moleculares implicadas en el estrés del RE, en el grupo de ratones db/db se observó una regulación al alza en *Ern1* respecto al no diabético. Se destacaron

cambios significativos marcados en el grupo db/db_{cat} respecto a los del grupo db/+ en la mayoría de las dianas estudiadas. Y en el caso de los genes *Atf4* y *Atf6*, estos resultaron ser significativos incluso en comparación con los db/db.

También se evaluaron dianas moleculares involucradas en procesos de estrés oxidativo y función mitocondrial, se exponen los resultados en la Tabla 37. El grupo de ratones con diabetes db/db mostró un marcado aumento significativo en la expresión génica de *Mnf2* respecto al grupo db/+. En cuanto a los db/db_{cat} presentaron regulaciones al alza en los genes *Cybb* y *Mnf2* en comparación con los no diabéticos.

Expresión génica (unidades relativas)	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
Estrés oxidativo				
<i>Sod2</i>	1,00 ± 0,10	1,32 ± 0,10	1,63 ± 0,34	0,21
<i>Cybb</i>	1,00 ± 0,16	1,43 ± 0,24	2,90 ± 0,80 *	<0,05
Función mitocondrial				
<i>Dnml1</i>	1,00 ± 0,09	1,59 ± 0,20	2,20 ± 0,53	0,12
<i>Opa1</i>	1,00 ± 0,06	1,58 ± 0,24	1,77 ± 0,43	0,17
<i>Mnf1</i>	1,00 ± 0,09	1,98 ± 0,37	2,04 ± 0,65	0,24
<i>Mnf2</i>	1,00 ± 0,18	5,52 ± 1,45 *	3,91 ± 1,18 *	<0,05

Tabla 37. Análisis de los niveles de los niveles de expresión génica de marcadores de estrés oxidativo y función mitocondrial en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=5-8 ratones por grupo). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+.

En nuestros modelos de DM2 también se determinó un perfil de marcadores proteicos de diversos procesos moleculares en miocardio. Los resultados se presentan en la Figura 33 y Tabla 38, no se detectaron diferencias significativas en la abundancia de las proteínas de ninguno de los marcadores evaluados.

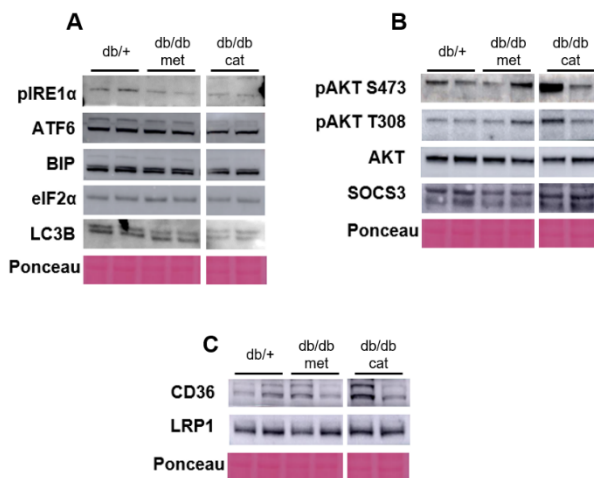


Figura 33. Análisis Western blot de marcadores de estrés de RE, autofagia y resistencia a la insulina en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}
A) Western blot representativo de las proteínas implicadas en estrés de RE: pIRE1α, ATF6, BIP, eIF2α y autofagia: LC3B. B) Western blot representativo de las proteínas involucradas en resistencia a la insulina: pAKT S473, pAKT T308, AKT y SOCS3. C) Western blot representativo de proteínas receptoras de lipoproteínas: CD36 y LRP1. Las señales de las proteínas medidas fueron normalizadas mediante la tinción Ponceau del gel.

Parámetros moleculares	db/+	db/db	db/db _{cat}	P
Marcadores de estrés de RE y autofagia				
pIRE1 α	0,36 \pm 0,04	0,32 \pm 0,05	0,33 \pm 0,05	0,54
ATF-6	0,08 \pm 0,003	0,10 \pm 0,009	0,08 \pm 0,010	0,58
BIP	0,29 \pm 0,01	0,27 \pm 0,006	0,23 \pm 0,02	0,07
eIF2 α	0,12 \pm 0,04	0,13 \pm 0,05	0,12 \pm 0,04	0,91
LC3B	0,59 \pm 0,09	0,58 \pm 0,08	0,54 \pm 0,06	0,95
Marcadores de resistencia a la insulina				
pAKT308	0,10 \pm 0,014	0,10 \pm 0,003	0,10 \pm 0,005	0,90
pAKT473	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	0,99
SOCS3	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,91
Receptores de lipoproteínas				
CD36	0,25 \pm 0,07	0,26 \pm 0,36	0,33 \pm 0,09	0,68
LRP-1	0,26 \pm 0,03	0,24 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,76

Tabla 38. Perfil de marcadores proteicos de estrés de RE, autofagia, resistencia a la insulina y receptores de lipoproteínas analizados por Western blot en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db y db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=5 ratones por grupo). En todos los casos las unidades son relativas a la carga (Ponceau). Todos los análisis se llevaron a cabo al finalizar el seguimiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

4.2 Evaluación del efecto de FTY720/Fingolimod sobre la CMD en modelos animales de DM2

4.2.1 Parámetros corporales y fenotipo

Ratones db/db

Como ya hemos descrito previamente, los ratones db/db desarrollaron espontáneamente diabetes y esteatosis cardíaca y se consideran un modelo animal válido para el estudio de la CMD. En este apartado se muestran los efectos de la administración oral de FTY720/Fingolimod en modelos de DM2 tanto en db/db como db/db_{cat}.

Parámetros corporales	db/+	db/db	db/db + FTY720	P
Peso corporal (g)	30,12 ± 0,42	44,98 ± 0,39 *	47,66 ± 1,75 *	<0,05
Consumo de dieta (g/día)	2,58 ± 0,16	8,52 ± 0,89 *	5,50 ± 0,42	<0,05
Consumo de bebida (mL/día)	4,44 ± 0,22	31,89 ± 3,36 *	7,49 ± 1,03	<0,05
Hígado (g)	1,28 ± 0,03	2,42 ± 0,10 *	2,38 ± 0,16 *	<0,05
Hígado/peso corporal	0,04 ± 0,0009	0,05 ± 0,002 *	0,05 ± 0,003 *	<0,05
Riñones (mg)	357 ± 13,20	390 ± 13,23	416 ± 24,23	0,11
Pulmones (mg)	145 ± 5,60	140 ± 6,58	147 ± 7,56	0,55
Corazón (mg)	159 ± 4,27	138 ± 3,28 *	150 ± 4,89	<0,05
Corazón/peso corporal	0,005 ± 0,0001	0,003 ± 7,22e-01 *	0,003 ± 0,00 *	<0,05
Longitud de tibia (mm)	19 ± 0,34	18 ± 0,15	17 ± 0,40 *	<0,05
Corazón/longitud de tibia	8,56 ± 0,21	7,79 ± 0,15	8,51 ± 0,45	0,06
Tejido adiposo pericárdico (g)	0,07 ± 0,01	1,84 ± 0,32 *	0,10 ± 0,02 †	<0,05
Tejido adiposo epididimal (g)	0,74 ± 0,02	2,28 ± 0,08 *	2,24 ± 0,12 *	<0,05
Tejido adiposo total (g)	2,65 ± 0,10	13,09 ± 0,54 *	12,75 ± 0,84 *	<0,05

Tabla 39. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros corporales de ratones db/+ y diabéticos db/db

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=9-11 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Al mes de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta de mantenimiento y tratados con o sin FTY720/Fingolimod en el agua de bebida durante 3 meses. Se midió la ingesta de alimentos y agua al final del estudio, como se describe en los Materiales y Métodos. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test

de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+; † $p < 0,05$ frente al grupo db/db.

Como era de esperar se replicó lo descrito en la primera sección de Resultados. En cuanto al fenotipo del grupo db/db sin tratamiento, mostraron mayor peso corporal (~1,49 veces; $p < 0,05$) respecto al grupo de animales no diabéticos (db/+). Esto se relacionó con un incremento importante de los tejidos adiposo total (~4,94 veces; $p < 0,05$), adiposo epididimal (~3,08 veces; $p < 0,05$) así como un marcado aumento en el tejido adiposo pericárdico (~26,29 veces; $p < 0,05$) en comparación con el grupo db/+ (Tabla 39).

En cuanto al consumo de bebida y dieta, los animales que recibieron el tratamiento con FTY720/Fingolimod presentaron los mismos niveles de consumo de comida que los del grupo db/db sin tratamiento. Respecto al consumo de bebida se observó una disminución, aunque no llegó a ser significativa en comparación al grupo diabético sin tratar.

Es importante recordar, tal como se describió en Materiales y Métodos, que al grupo tratado se le administró un suplemento de FTY720/Fingolimod a través del agua, desde las 4 semanas de edad hasta las 16 semanas. Los demás grupos recibieron sólo el vehículo (agua) el mismo período de tiempo.

De tal manera a asegurarnos que el tratamiento se recibió y metabolizó adecuadamente, en una muestra representativa del grupo db/db tratado, se midieron las concentraciones del fármaco FTY720/Fingolimod y su forma fosforilada; que es producto de la metabolización por parte del hígado, en muestras de plasma y miocardio de esos animales (Figura 34: A). Efectivamente, se comprobaron que los niveles plasmáticos de la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod aumentaron de manera significativa; éstos también se correlacionaron con los niveles detectados en miocardio de los animales tratados (Figura 34: D).

Es destacable que, a nivel macroscópico no hubo cambios en los órganos que metabolizan el fármaco, así el peso del hígado y de los riñones se mantuvieron en el rango normal descrito para esta patología (Tabla 39).

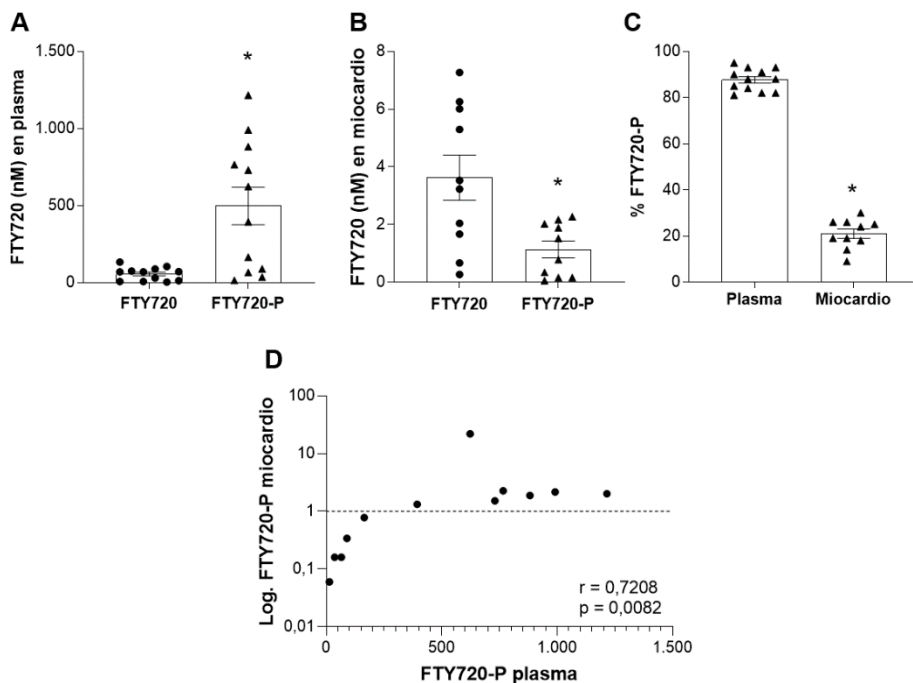


Figura 34. Niveles de FTY720/Fingolimod y la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod en plasma y miocardio de ratones diabéticos db/db

Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=12 ratones). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. A) Se muestran los niveles plasmáticos de FTY720/Fingolimod y su forma fosforilada. B) Niveles en miocardio de FTY720/Fingolimod y su forma fosforilada. C) Porcentaje de la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod en plasma y miocardio. D) Correlación entre los niveles plasmáticos de FTY720/Fingolimod fosforilado y en miocardio. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en A, B y C se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, $*p < 0,05$ frente a la forma no fosforilada de FTY720/Fingolimod. Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados.

Adicionalmente, la administración oral de FTY720/Fingolimod en el modelo db/db, no se asoció a cambios significativos en la mayoría de los parámetros corporales medidos. La excepción fue la drástica y

sorprendente disminución significativa del tejido adiposo pericárdico en ratones db/db tratados con FTY720/Fingolimod (~95%; $p < 0,05$) (Tabla 39).

Como ya se describió previamente; la existencia de un subgrupo de animales db/db que evolucionó a una diabetes exacerbada, catabólica, este porcentaje de ratones se presentó nuevamente en la tanda sometida al tratamiento. De este modo, se consideraron como un nuevo grupo db/db_{cat} y se procedió a registrar y analizar en paralelo los mismos parámetros que aquellos medidos en los ratones db/db.

Ratones db/db_{cat}

En la Tabla 40 se muestran los parámetros corporales medidos en los diferentes grupos experimentales del modelo de diabetes catabólica. Una vez más se replicó lo observado en la sección 4.1.1c, en la que se describió que el grupo db/db_{cat} al final del período de seguimiento presentó tal pérdida de peso corporal que éste alcanzó valores similares al del grupo no diabético (peso corporal: db/db_{cat} $32,73 \pm 1,70$ versus db/+ : $30,12 \pm 0,42$). En este caso, el peso del corazón fue significativamente menor en los animales con db/db_{cat} respecto al grupo no diabético (~12%; $p < 0,05$) acompañándose de una disminución en la relación corazón/peso corporal (~20%; $p < 0,05$).

En los animales db/db_{cat} que recibieron tratamiento con FTY720/Fingolimod se observó una tendencia a menor pérdida de peso corporal (db/db_{cat} + FTY720: $34,66 \pm 1,75$ versus db/+ : $30,12 \pm 0,42$; $p = 0,07$). Esto se asoció a mayor acumulación de tejido adiposo total (~2,78 veces; $p < 0,05$) y epididimal (~2,35 veces; $p < 0,05$) en comparación con los no diabéticos. A diferencia del grupo db/db_{cat} sin tratar, el grupo en tratamiento con FTY720/Fingolimod no exhibió cambios en el peso del corazón y la relación corazón/peso corporal fue similar al grupo no diabético.

Parámetros corporales	db/+	db/db _{cat}	db/db _{cat} + FTY720	P
Peso corporal (g)	30,12 ± 0,42	32,73 ± 1,70	34,66 ± 1,75	0,07
Consumo de dieta (g/día)	2,58 ± 0,16	9,52 ± 3,35 *	5,92 ± 1,13	<0,05
Consumo de bebida (g/día)	4,44 ± 0,22	24,27 ± 3,10 *	39,88 ± 1,44 *	<0,05
Hígado (g)	1,28 ± 0,03	2,08 ± 0,13 *	2,18 ± 0,09 *	<0,05
Hígado/peso corporal	0,04 ± 0,001	0,06 ± 0,003 *	0,06 ± 0,004 *	<0,05
Riñones (mg)	357 ± 13,20	424 ± 43,92	443 ± 22,97	<0,05
Pulmones (mg)	145 ± 5,60	127 ± 6,22	137 ± 9,01	0,12
Corazón (mg)	159 ± 4,27	140 ± 4,55 *	155 ± 4,74	<0,05
Corazón/peso corporal	0,005 ± 0,00	0,004 ± 0,00 *	0,004 ± 0,00	<0,05
Longitud de tibia (mm)	19 ± 0,34	17 ± 0,21	17 ± 0,17 *	<0,05
Corazón/longitud de tibia	8,56 ± 0,21	8,11 ± 0,29	9,17 ± 0,31	0,12
Tejido adiposo pericárdico (g)	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01 *	0,06 ± 0,01	<0,05
Tejido adiposo epididimal (g)	0,74 ± 0,02	1,43 ± 0,22	1,74 ± 0,14 *	<0,05
Tejido adiposo total (g)	2,65 ± 0,10	5,67 ± 0,91	7,36 ± 0,74 *	<0,05

Tabla 40. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros corporales de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=7-9 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Al mes de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta de mantenimiento y tratados con o sin FTY720/Fingolimod durante 3 meses. Se midió la ingesta de alimentos y agua al final del estudio, como se describe en los Materiales y Métodos. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+.

4.2.1a Bioquímica plasmática

Ratones db/db

El efecto de la administración del FTY720/Fingolimod sobre los parámetros bioquímicos plasmáticos en el modelo de DM2 metabólica se muestra en la Tabla 41.

Bioquímica plasmática	db/+	db/db	db/db + FTY720	P
Glucosa (mM)	10,19 ± 0,49	46,03 ± 2,42 *	39,54 ± 2,74 *	<0,05
Insulina (ng/L)	0,64 ± 0,10	1,96 ± 0,34 *	2,15 ± 0,45 *	<0,05
Glucosa x Insulina	2,92 ± 0,53	39,35 ± 8,46 *	45,56 ± 13,34 *	<0,05
Adipo-IR	0,014 ± 0,00	0,045 ± 0,00 *	0,120 ± 0,05 *	<0,05
Adiponectina (ng/mL)	3865 ± 190	3519 ± 434	3413 ± 264	0,44
ALT (U/L)	34 ± 4,16	178 ± 43,39 *	223 ± 44,39 *	<0,05
AST (U/L)	195 ± 29,86	297 ± 71,47	240 ± 38,86	0,56
Creatinina (μmol/L)	0,034 ± 0,00	0,052 ± 0,00 *	0,055 ± 0,00 *	<0,05
BUN (μM)	5,60 ± 0,30	6,00 ± 0,39	6,62 ± 0,47	0,29
Colesterol total (mM)	2,69 ± 0,09	3,10 ± 0,15	3,56 ± 0,13 *	<0,05
Colesterol HDL (mM)	1,87 ± 0,10	2,73 ± 0,10 *	2,83 ± 0,12 *	<0,05
Colesterol no-HDL (mM)	0,82 ± 0,06	0,45 ± 0,08 *	0,73 ± 0,12	<0,05
Triglicéridos (mM)	0,98 ± 0,10	1,69 ± 0,15 *	0,99 ± 0,14 †	<0,05
AGL (mM)	0,82 ± 0,06	1,16 ± 0,16	1,37 ± 0,10 *	<0,05

Tabla 41. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros bioquímicos plasmáticos de ratones db/+ y diabéticos db/db

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=9-11 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+; †p<0,05 frente al grupo db/db.

Como ya se describió anteriormente los animales del grupo db/db cursaron con niveles importantes de hiperglucemia y dislipidemia, siendo esta última caracterizada por un incremento de los niveles plasmáticos de triglicéridos (~1,72 veces; p<0,05) respecto al grupo db/+. El metabolismo de la insulina se encontró alterado, dado por los niveles aumentados de insulina

(~3,06 veces; $p < 0,05$) y subsecuentemente los índices Glucosa x Insulina (~13,48; $p < 0,05$) y Adipo-IR (~3,21; $p < 0,05$).

Se observó que el tratamiento con FTY720/Fingolimod causó principalmente una disminución en las concentraciones circulantes de triglicéridos en ratones db/db, llegando a niveles similares al del grupo no diabético (~41%; $p < 0,05$). Todos los demás parámetros medidos no sufrieron modificaciones favorables en presencia del tratamiento. Cabe destacar que la presencia de FTY720/Fingolimod en el grupo diabético metabólico, no alteró los parámetros de funcionalidad hepática y renal.

Ratones db/db_{cat}

En lo que respecta a la bioquímica plasmática en este modelo animal, se presentan los datos en la Tabla 42. Se volvió a replicar lo observado en la tanda anterior de estos animales. Los mismos presentaron hiperglucemia (~5,05 veces; $p < 0,05$) en comparación con los no diabéticos, acompañados de la alteración en el metabolismo de la insulina producto Glucosa x Insulina (~7,75 veces; $p < 0,05$) y el índice Adipo-IR aumentado (~4 veces; $p < 0,05$).

El tratamiento con FTY720/Fingolimod no supuso cambios significativos en los parámetros evaluados respecto al grupo db/db_{cat} no tratado.

Bioquímica plasmática	db/+	db/db _{cat}	db/db _{cat} + FTY720	P
Glucosa (mM)	10,19 ± 0,49	51,55 ± 1,71 *	51,87 ± 3,30 *	<0,05
Insulina (ng/L)	0,64 ± 0,10	1,05 ± 0,12	1,43 ± 0,30	0,06
Glucosa x Insulina	2,92 ± 0,53	22,65 ± 2,93 *	35,13 ± 8,89 *	<0,05
Adipo-IR	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01 *	0,04 ± 0,01 *	<0,05
Adiponectina (ng/mL)	3865 ± 190	2454 ± 190 *	2329 ± 285 *	<0,05
ALT (U/L)	34 ± 4,16	145 ± 39,04 *	198 ± 27,27 *	<0,05
AST (U/L)	195 ± 29,86	290 ± 82,46	262 ± 50,11	0,47
Creatinina (µmol/L)	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00 *	0,06 ± 0,00 *	<0,05
BUN (µM)	5,60 ± 0,30	7,05 ± 0,36	9,65 ± 1,06 *	<0,05
Colesterol total (mM)	2,69 ± 0,09	3,19 ± 0,33	3,29 ± 0,39	0,17
Colesterol HDL (mM)	1,87 ± 0,10	2,40 ± 0,14 *	2,57 ± 0,16 *	<0,05
Colesterol no-HDL (mM)	0,82 ± 0,06	0,80 ± 0,21	0,72 ± 0,29	0,12
Triglicéridos (mM)	0,98 ± 0,10	1,16 ± 0,18	1,32 ± 0,22	0,37
AGL (mM)	0,82 ± 0,06	1,25 ± 0,18	1,04 ± 0,06	<0,05

Tabla 42. Efecto de la administración de FTY720 sobre los parámetros bioquímicos plasmáticos de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=6-9 ratones por grupo). Todos los análisis se realizaron en ratones de cuatro meses de edad. Los niveles plasmáticos de las fracciones HDL se determinaron en los sobrenadantes plasmáticos tras precipitarlos con ácido fosfotúngstico (Roche); la fracción no-HDL se calculó restando la fracción HDL del plasma total. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

4.2.2 Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la funcionalidad cardíaca

Se evaluó el efecto del FTY720/Fingolimod sobre la función cardíaca en los dos modelos de estudio, tanto en diabetes como la catabólica. Los parámetros cardíacos fueron determinados por ecocardiografía al final del tratamiento (ratones de 4 meses de edad) y se presentan a continuación.

Ratones db/db

De acuerdo con lo reportado previamente en la sección 4.1.1c, en esta nueva tanda de animales el grupo db/db sin tratamiento presentó disfunción diastólica, revelada por el incremento de la relación entre el flujo mitral diastólico temprano y tardío (MV E/A: ~1,12 veces; $p < 0,05$) respecto al grupo db/+ (Tabla 43). Este aumento en la relación de ondas E/A fue debido a la disminución de las ondas pasiva (onda E: 34%; $p < 0,05$) y activa (onda A: 41%; $p < 0,05$), respectivamente. El fenotipo se acompañó del aumento en los tiempos de contracción (IVCT: ~1,26 veces; $p < 0,05$) y relajación (IVRT: ~1,26 veces; $p < 0,05$) en comparación con el grupo no diabético.

Parámetros Función diastólica	db/+	db/db	db/db + FTY720	P
AET (ms)	54,47 ± 2,12	58,05 ± 2,12	50,31 ± 0,74 †	<0,05
IVCT (ms)	16,48 ± 1,11	20,83 ± 1,22 *	17,08 ± 0,70	<0,05
IVRT (ms)	22,60 ± 0,53	28,56 ± 1,07 *	25,94 ± 0,51 *	<0,05
MV A (mm/s)	418,5 ± 21,12	245,5 ± 18,91*	268,9 ± 31,08 *	<0,05
MV E (mm/s)	670,5 ± 39,91	440,4 ± 33,44*	419,0 ± 44,47 *	<0,05
MV ET (ms)	75,57 ± 3,57	86,60 ± 5,09	71,49 ± 4,58	0,07
MV E/A	1,60 ± 0,04	1,80 ± 0,05 *	1,57 ± 0,05 †	<0,05

Tabla 43. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros de la función diastólica en ratones db/+ y diabéticos db/db

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=6-9 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se llevaron a cabo al finalizar el tratamiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db.

Abreviaturas: AET (del inglés, *Aortic Ejection Time*); IVCT (del inglés, *Isovolumetric Contraction Time*); IVRT (del inglés, *Isovolumetric Relaxation Time*); MV A (del inglés, *Mitral A-wave velocity*); MV E (*Mitral E-wave velocity*); MV ET (del inglés, *Mitral Valve Ejection Time*); MV E/A (del inglés, *Mitral valve E/A ratio*).

Después de 3 meses de tratamiento con FTY720/Fingolimod, la disfunción diastólica en el modelo db/db se vio corregida. Se observó una mejora significativa de ~13% en la relación de las ondas E/A ($1,57 \pm 0,05$; $p < 0,05$) respecto al grupo db/db sin tratamiento (MV E/A: $1,80 \pm 0,05$) y se logró un nivel comparable con el grupo de animales no diabéticos (MV E/A: $1,60 \pm 0,04$). También se reportó una disminución significativa en el tiempo de eyección de la válvula aórtica (AET: ~13%; $p < 0,05$) respecto al grupo diabético sin tratamiento y llegó a ser comparable al grupo no diabético (db/+).

Parámetros Función sistólica	db/+	db/db	db/db + FTY720	P
LVAW (d) (mm)	$0,91 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,04$ *	$0,87 \pm 0,04$	<0,05
IVS (d) (mm)	$0,89 \pm 0,06$	$0,76 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,02$	0,06
LVID (d) (mm)	$3,77 \pm 0,10$	$3,67 \pm 0,07$	$3,36 \pm 0,12$ *	<0,05
LVPW (d) (mm)	$0,89 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,02$ *	$0,82 \pm 0,02$	<0,05
LVAW (s) (mm)	$1,36 \pm 0,08$	$1,24 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,06$	0,44
IVS (s) (mm)	$1,36 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,03$	0,07
LVID (s) (mm)	$2,62 \pm 0,14$	$2,60 \pm 0,09$	$2,42 \pm 0,10$	0,40
LVPW (s) (mm)	$1,23 \pm 0,08$	$1,07 \pm 0,03$	$1,17 \pm 0,03$	0,13
%EF	$61,58 \pm 4,20$	$56,42 \pm 2,46$	$55,31 \pm 2,49$	0,31
%FS	$33,16 \pm 3,01$	$29,19 \pm 1,68$	$29,77 \pm 2,72$	0,49
LV mass (mg)	$118,17 \pm 2,67$	$95,61 \pm 2,82$ *	$95,82 \pm 6,30$ *	<0,05
LV vol (d) (μ L)	$62,46 \pm 3,66$	$57,06 \pm 2,37$	$46,61 \pm 4,01$ *	<0,05
LV vol (s) (μ L)	$24,74 \pm 3,56$	$25,11 \pm 1,99$	$21,30 \pm 2,16$	0,42

Tabla 44. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros de la función sistólica en ratones db/+ y diabéticos db/db

Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=9 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se llevaron a cabo al finalizar el tratamiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del

post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+. Abreviaturas: LVAW (del inglés, *Left Ventricle anterior wall*); IVS (del inglés, *Interventricular Septal Thickness*); LVID (del inglés, *Left Ventricle Internal Dimension*); LVPW (del inglés, *Left Ventricle posterior wall*); %EF (*Ejection Fraction*); %FS (*Fractional Shortening*); LV mass (del inglés, *Left Ventricle mass*); LV vol (*Left Ventricle volume*); d (diástole) y s (sístole).

En la tabla 44 se muestran los parámetros de la función sistólica en los animales con db/db tratados y sin tratar. Esta se encontró preservada y revelada por las fracciones de eyección (%EF) y acortamiento (%FS) sin cambios significativos respecto al grupo no diabético. La masa del ventrículo izquierdo en los diabéticos se encontró disminuida respecto al grupo db/+ (LV mass: ~19%; $p < 0,05$) sin cambios favorables en presencia de FTY720/Fingolimod.

Expresión génica y abundancia proteica de marcadores implicados en el metabolismo de esfingolípidos

Como el FTY720/Fingolimod es un análogo estructural de la S1P, evaluamos si la expresión génica de los receptores implicados en la captación de S1P, así como las enzimas responsables de la posterior fosforilación, se encontraban afectadas por la administración del fármaco.

En el grupo de animales db/db se presentó una sobreexpresión del gen *S1p1* respecto al grupo no diabético (Figura 35). Las demás dianas evaluadas permanecieron sin cambios. La administración de FTY720/Fingolimod no modificó la expresión génica de ninguna de las dianas analizadas.

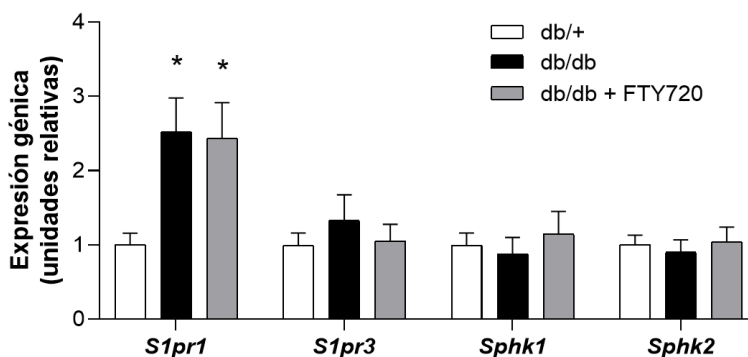


Figura 35. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores del metabolismo esfingolipídico en ratones db/+ y diabéticos db/db

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=7-10 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Para comprobar si el aumento de la expresión de los niveles de RNAm del receptor 1 de S1P (*S1p1*) se traducían en cambios a nivel de la proteína, se procedió a medirla por técnicas de inmunohistoquímica en miocardios incluidos en parafina. No se presentaron diferencias en la abundancia de la proteína S1PR1 en miocardio de nuestros animales diabéticos (Figura 35).

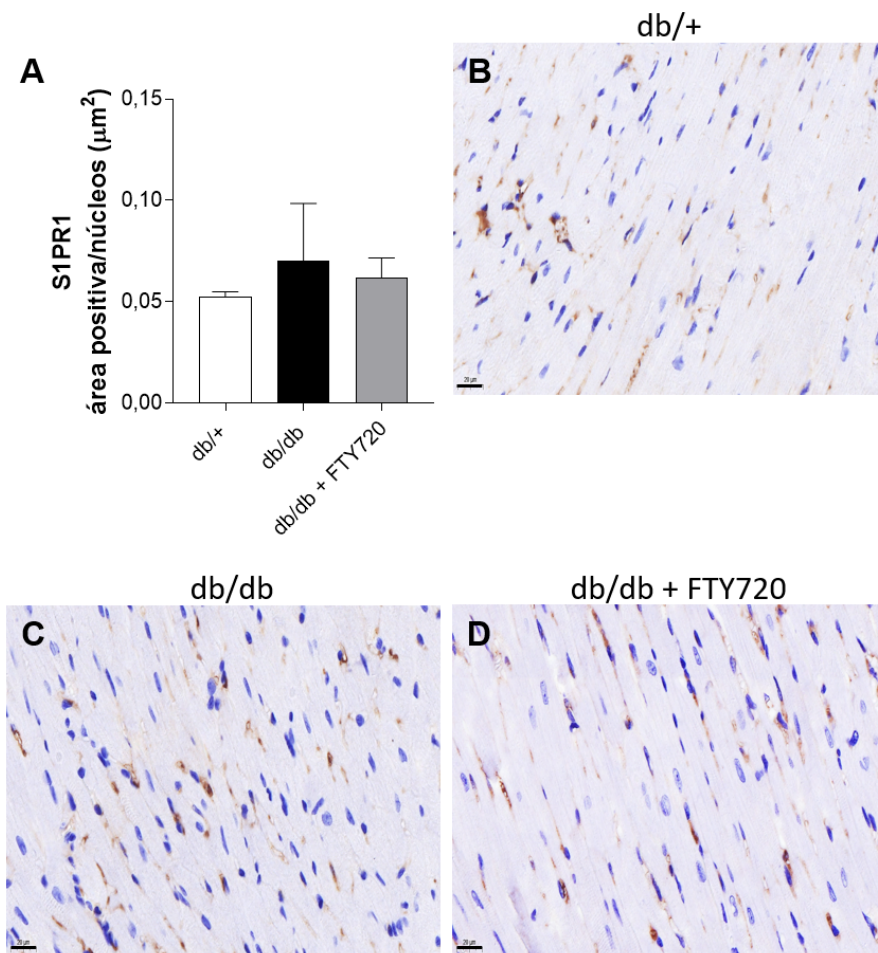


Figura 36. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre S1PR1 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

A) Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. B); C) y D) micrografías de miocardio de muestras representativas de la inmunohistoquímica para la detección de S1PR1. Las imágenes fueron captadas a 40x de aumento y la escala es 20 μm .

Expresión génica de marcadores de daño de tejido miocárdico

Con el fin de explorar a nivel molecular la disfunción miocárdica en nuestros modelos animales de DM2, abordamos el análisis de la expresión de genes involucrados en estos procesos.

En el modelo db/db en general no se observaron cambios significativos a nivel de la expresión génica de las dianas de interés en comparación con los no diabéticos (Figura 37). El fármaco ejerció la regulación a la baja del gen *Nppb* respecto al grupo db/+.

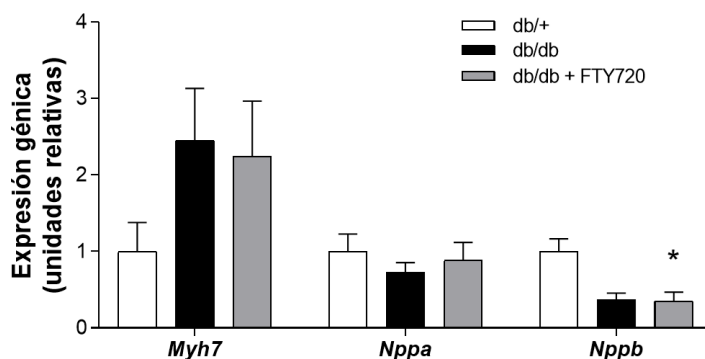


Figura 37. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de daño miocárdico en ratones db/+ y diabéticos db/db

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Ratones db/db_{cat}

El efecto del tratamiento con FTY720/Fingolimod sobre la CMD en el modelo de diabetes catabólica, se muestra en la

Tabla 45. De acuerdo con lo reportado anteriormente en nuestro estudio y en esta nueva tanda de animales db/db_{cat}, la función diastólica nuevamente se encontró alterada (MV E/A: ~1,19 veces; $p < 0,05$) respecto a los animales no diabéticos. Este incremento fue consecuente con la disminución de las ondas pasiva (onda E: 26%; $p < 0,05$) y activa (onda A: 38%; $p < 0,05$), en comparación con el grupo db/+. Todo esto acompañado

de un aumento en el tiempo de relajación (IVRT: ~1,18 veces; $p < 0,05$) respecto a los ratones no diabéticos.

Parámetros Función diastólica	db/+	db/db _{cat}	db/db _{cat} + FTY720	P
AET (ms)	54,47 ± 2,12	46,15 ± 2,22	51,59 ± 3,74	0,11
IVCT (ms)	16,48 ± 1,11	16,72 ± 0,51	20,56 ± 2,27	0,12
IVRT (ms)	22,60 ± 0,53	26,62 ± 1,33 *	24,76 ± 0,89	<0,05
MV A (mm/s)	418,5 ± 21,12	257,9 ± 26,66 *	393,9 ± 39,18 †	<0,05
MV E (mm/s)	670,5 ± 39,91	494,5 ± 54,73 *	608,9 ± 50,43	0,05
MV ET (ms)	75,57 ± 3,57	69,56 ± 4,25	67,65 ± 2,99	0,28
MV E/A	1,60 ± 0,04	1,91 ± 0,04 *	1,66 ± 0,05 †	<0,05

Tabla 45. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/ Fingolimod sobre los parámetros de la función diastólica en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=7-9 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se llevaron a cabo al finalizar el tratamiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db_{cat}. Abreviaturas: AET (del inglés, *Aortic Ejection Time*); IVCT (del inglés, *Isovolumetric Contraction Time*); IVRT (del inglés, *Isovolumetric Relaxation Time*); MV A (del inglés, *Mitral A-wave velocity*); MV E (*Mitral E-wave velocity*); MV ET (del inglés, *Mitral Valve Ejection Time*); MV E/A (del inglés, *Mitral valve E/A ratio*).

Nuestros datos revelaron el efecto favorable del FTY720/Fingolimod sobre la disfunción diastólica más severa en este modelo de db/db_{cat} (

Tabla 45). Así, se observó una disminución significativa de la relación MV E/A (~13%; $p < 0,05$) en comparación con el grupo db/db_{cat} sin tratar, alcanzando valores similares a los del grupo no diabético (MV E/A; db/db_{cat} + FTY720: 1,66 ± 0,05 versus db/+: 1,60 ± 0,04).

La mejoría de la función diastólica se atribuyó principalmente al incremento significativo en el llenado diastólico tardío, onda A (~1,53 veces; $p < 0,05$) respecto al grupo db/db_{cat} sin tratamiento. También se presentó una tendencia al aumento en la onda E respecto a los diabéticos catabólicos

no tratados. En ambos casos, el tratamiento con FTY720/Fingolimod mostró tal mejora en los parámetros descritos, que se obtuvieron niveles similares a los de ratones no diabéticos (grupo db/+).

La función sistólica se encontró preservada en este modelo animal de diabetes catabólica, no se exhibieron cambios significativos tanto en la fracción de eyección (%EF) como en la fracción de acortamiento (%FS), en comparación con los no diabéticos (Tabla 46).

Parámetros Función sistólica	db/+	db/db _{cat}	db/db _{cat} + FTY720	P
LVAW (d) (mm)	0,91 ± 0,06	0,80 ± 0,02	0,94 ± 0,04	0,17
IVS (d) (mm)	0,89 ± 0,06	0,80 ± 0,04	0,87 ± 0,03	0,37
LVID (d) (mm)	3,77 ± 0,10	3,78 ± 0,13	3,96 ± 0,05	0,36
LVPW (d) (mm)	0,89 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,91 ± 0,02 †	<0,05
LVAW (s) (mm)	1,36 ± 0,08	1,31 ± 0,06	1,44 ± 0,06	0,48
IVS (s) (mm)	1,36 ± 0,06	1,27 ± 0,08	1,40 ± 0,06	0,43
LVID (s) (mm)	2,62 ± 0,14	2,54 ± 0,13	2,76 ± 0,07	0,48
LVPW (s) (mm)	1,23 ± 0,08	1,14 ± 0,04	1,21 ± 0,04	0,58
%EF	61,58 ± 4,20	61,60 ± 3,39	57,77 ± 2,26	0,68
%FS	33,16 ± 3,01	32,92 ± 2,48	30,25 ± 1,49	0,66
LV mass (mg)	118,17 ± 2,67	107,6 ± 5,78	136,7 ± 3,09 * †	<0,05
LV vol (d) (µL)	62,46 ± 3,66	62,03 ± 4,80	68,25 ± 2,01	0,44
LV vol (s) (µL)	24,74 ± 3,56	23,85 ± 2,96	28,78 ± 1,77	0,48

Tabla 46. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre los parámetros de la función sistólica en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=7-9 ratones por grupo). Todos los análisis ecocardiográficos se llevaron a cabo al finalizar el tratamiento, a los 4 meses de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, * p<0,05 frente al grupo db/+ y † p<0,05 frente al grupo db/db_{cat}. Abreviaturas: LVAW (del inglés, *Left Ventricle anterior wall*); IVS (del inglés, *Interventricular Septal Thickness*); LVID (del inglés, *Left Ventricle Internal Dimension*); LVPW (del inglés, *Left Ventricle posterior wall*); %EF (*Ejection Fraction*); %FS (*Fractional Shortening*); LV mass (del inglés, *Left Ventricle mass*); LV vol (*Left Ventricle volume*); d (diástole) y s (sístole).

La suplementación con FTY720/Fingolimod no produjo cambios a nivel de la función sistólica. Se mantuvieron las fracciones de eyección y acortamiento y no se presentaron cambios ni respecto a los diabéticos catabólicos sin tratamiento, ni respecto al grupo no diabético. El grupo tratado mostró un aumento significativo en la masa del ventrículo izquierdo (~1,27 veces; $p < 0,05$) respecto tanto a los db/db_{cat} como a los db/+. Esto se acompañó del incremento significativo en el espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW: ~1,14 veces; $p < 0,05$) respecto al grupo diabético sin FTY720/Fingolimod y llegando a niveles similares del grupo no diabético.

Expresión génica y abundancia proteica de marcadores implicados en el metabolismo de esfingolípidos

En el modelo animal de diabetes catabólica a nivel de expresión génica los ratones db/db_{cat} no mostraron diferencias significativas respecto al grupo no diabético (Figura 38). Sin embargo, los ratones db/db_{cat} tratados con FTY720/Fingolimod exhibieron un marcado aumento en los niveles de RNAm del gen *S1pr1* en comparación con los no diabéticos.

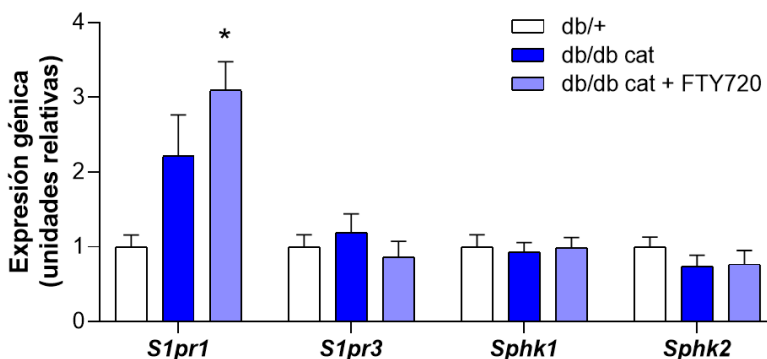


Figura 38. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores del metabolismo esfingolípido en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias ± error estándar de la media (n=7-10 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se

determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Mediante inmunohistoquímica de secciones parafinadas de miocardio, evaluamos la abundancia relativa de la proteína S1PR1 en este modelo de diabetes avanzada. Los miocardios de los animales del grupo db/db_{cat} mostraron un aumento significativo en la proteína S1PR1 respecto al grupo no diabético (~3,47 veces; $p < 0,05$) (Figura 39). Esta abundancia relativa se vio significativamente disminuida en presencia de FTY720/Fingolimod (~80%; $p < 0,05$), en el grupo de diabéticos catabólicos tratado y llegaron a niveles comparables con los observados en el grupo db/+.

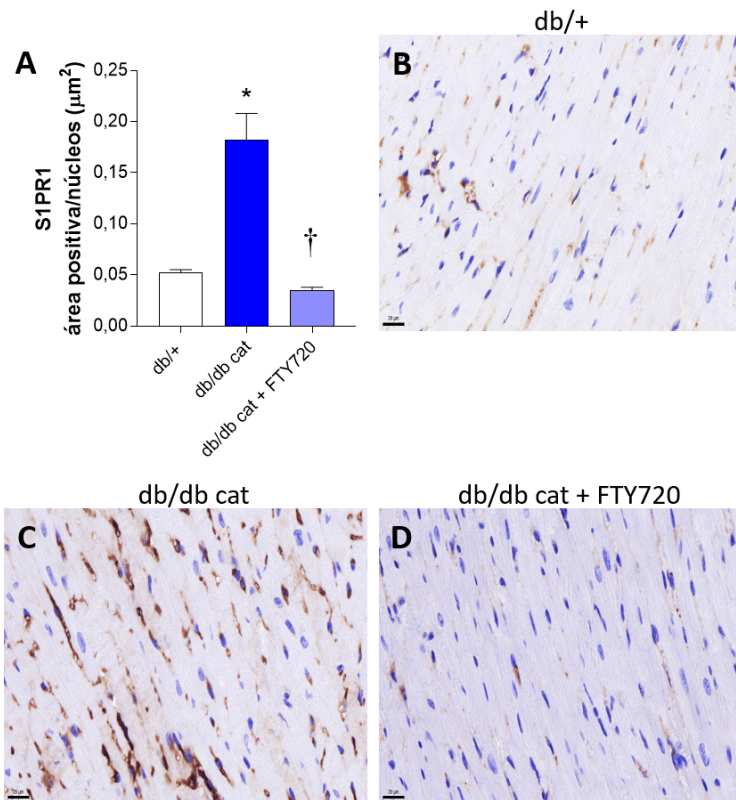


Figura 39. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre S1PR1 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

A) Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada

variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+ y $\dagger p < 0,05$ frente al grupo db/db_{cat}. B); C) y D) micrografías de miocardio de muestras representativas de la inmunohistoquímica para la detección de S1PR1. Las imágenes fueron captadas a 40x de aumento y la escala es 20 μm .

También se exploró la abundancia de esta proteína en miocardio utilizando el análisis por Western blot, resultados que se muestran la Figura 40. Los miocardios del grupo de ratones diabéticos catabólicos, exhibieron un incremento significativo de los niveles relativos de esta proteína. En cambio, en presencia del fármaco, los animales tratados mostraron una abundancia relativa de la proteína S1PR1 similar a los no diabéticos.

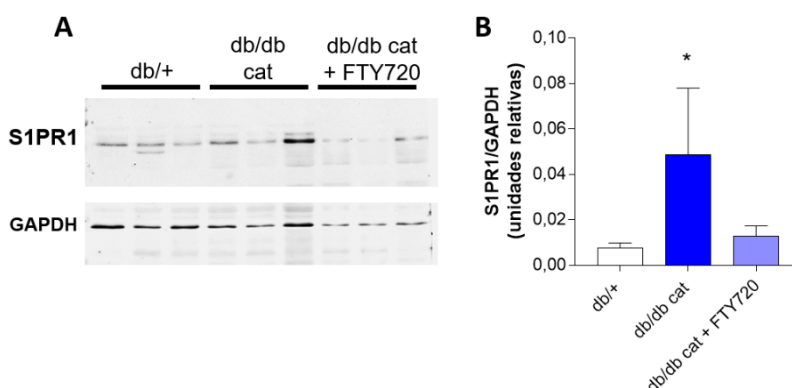


Figura 40. Análisis Western blot de la proteína S1PR1 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat} en presencia/ausencia de FTY720/Fingolimod

A) Western blot de la proteína S1PR1 en miocardio, se muestra un gel representativo con $n=3$. B) Cuantificación de la señal de S1PR1. La señal de la proteína medida fue normalizada mediante GAPDH y los datos presentados como media \pm error estándar de la media ($n=5$ ratones por cada grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, $*p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Expresión génica de marcadores de daño de tejido miocárdico

Respecto a las dianas moleculares involucradas en la regulación del daño a nivel de miocardio, los animales con diabetes catabólica mostraron una regulación al alza en el gen *Myh7*, respecto al grupo no diabético (Figura 41). En presencia del tratamiento con FTY720/Fingolimod no se

presentaron cambios en la expresión relativa de los genes diana analizados.

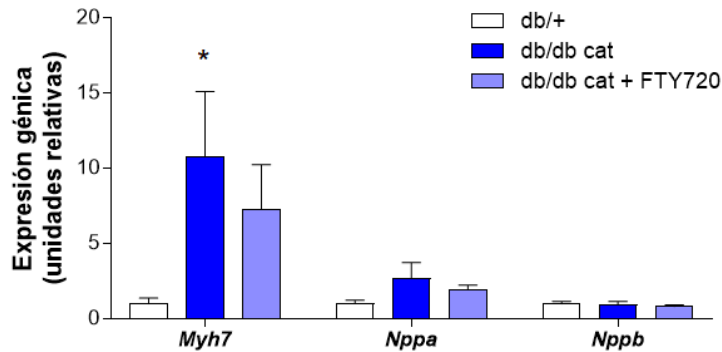


Figura 41. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de daño miocárdico en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

4.2.3 Efectos de FTY720/Fingolimod sobre dianas moleculares implicadas en la fisiopatología de la CMD

4.2.3a Efecto de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación

Para explorar el efecto antiinflamatorio de FTY720/Fingolimod sobre los dos fenotipos de diabetes, db/db y db/db_{cat}, respectivamente, en primer lugar se midieron los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatoria.

Ratones db/db

En ratones diabéticos se encontró un incremento significativo en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias, tales como MCP-1 (~3,28 veces; $p < 0,05$) y $TNF\alpha$ (~4,52 veces; $p < 0,05$), respecto al grupo no diabético (Figura 42). Esto acompañado del aumento de los niveles secretados de IL-10 (~12,13 veces; $p < 0,05$) en comparación con los animales no diabéticos.

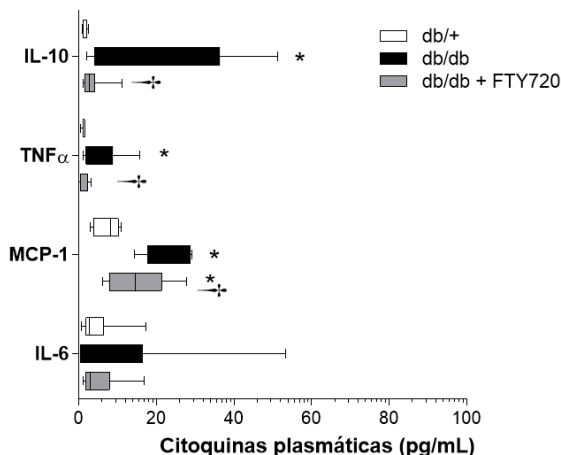


Figura 42. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación sistémica en ratones db/+ y diabéticos db/db

Los resultados se presentan como medianas \pm mínimo y máximo ($n=5$ ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey;

las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db.

El tratamiento con FTY720/Fingolimod mejoró los marcadores plasmáticos de inflamación en los ratones db/db. Este efecto antiinflamatorio consistió en la disminución importante de los niveles de citoquinas proinflamatorias TNF α (~78%; $p < 0,05$) y MCP-1 (~35%; $p < 0,05$) en plasma de estos animales, en comparación con los no tratados (Figura 42). Además, los db/db tratados con el fármaco exhibieron una disminución en los niveles de la citoquina antiinflamatoria, IL-10 (~81% veces; $p < 0,05$) respecto al grupo que no recibió el tratamiento (Figura 42).

Para explorar si la inflamación sistémica revelada por el aumento de las citoquinas plasmáticas se relacionaba con cambios en la expresión génica a nivel local, se procedió a medir los niveles de RNAm de dianas moleculares de inflamación en el miocardio de estos animales (

Figura 43).

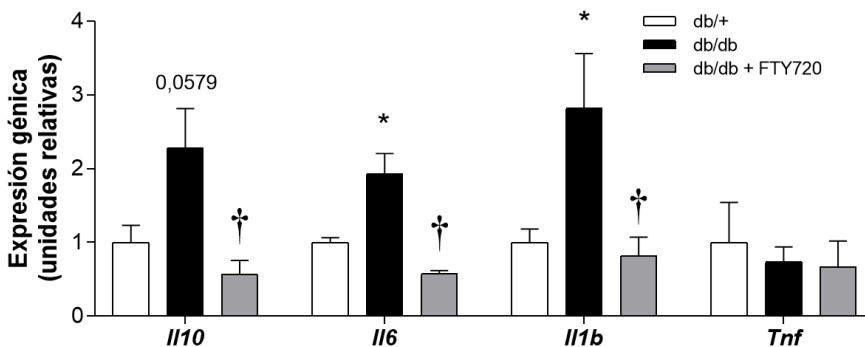


Figura 43. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso. En concreto, * $p < 0,05$ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db.

En el grupo de animales db/db se observó la regulación al alza en los genes que codifican para las citoquinas proinflamatorias *Il6* e *Il1b*. Además, se reportó una tendencia a la regulación al alza en la citoquina antiinflamatoria *Il10* (Figura 43).

En lo que se refiere a los ratones diabéticos tratados con FTY720/Fingolimod, se detectaron regulaciones a la baja de los genes *Il6* e *Il1b*, en comparación con sus congéneres db/db no tratados. Este efecto también se acompañó de una disminución significativa de los niveles de RNAm de *Il10* respecto a los db/db no tratados (Figura 43)

A fin de evaluar si la inflamación sistémica observada en el modelo db/db se acompañaba de signos de inflamación en el miocardio de estos ratones, se realizaron estudios de inmunohistoquímica para la detección representantes de citoquinas pro y antiinflamatoria, tales como TNF α e IL-10. En este caso, ninguna de las citoquinas analizadas presentó diferencias significativas en miocardio de los ratones diabéticos y no diabéticos (Figura 44).

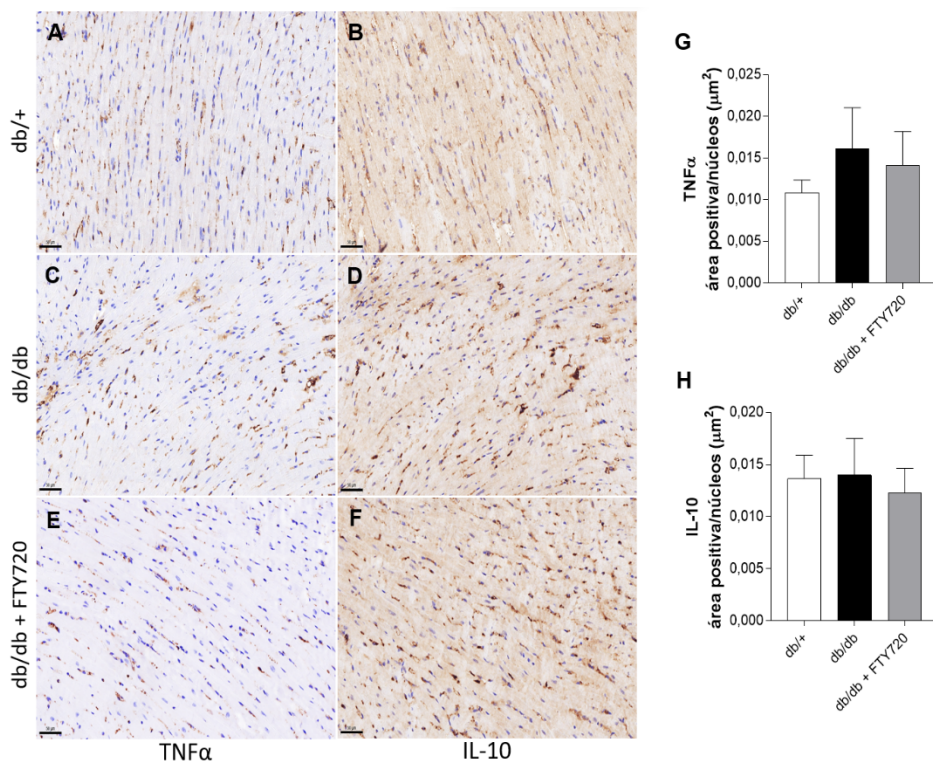


Figura 44. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

Imágenes representativas de miocardio. En A, C y E se muestran imágenes de la tinción mediante inmunohistoquímica de TNF α de los grupos de estudio. En B, D y F se muestran imágenes de la marca de IL-10 de los grupos de estudio. Las imágenes fueron captadas a 20x de aumento y la escala es 50 μ m. Los resultados de la cuantificación de la marca de cada citoquina se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=5 ratones por grupo) en G) TNF α y en H) IL-10. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

NF- κ B p65 está indicado como un regulador de los procesos inflamatorios. Su forma activada se trasloca al núcleo celular para regular la expresión génica de citoquinas proinflamatorias³⁰³. Por este motivo exploramos la abundancia relativa de esta proteína empleando técnicas inmunohistoquímicas en miocardio de nuestros modelos animales. Sin embargo, no se observó cambio en la abundancia de esta proteína en el modelo de db/db, respecto al grupo no diabético (Figura 45). Tampoco se observó respuesta al fármaco.

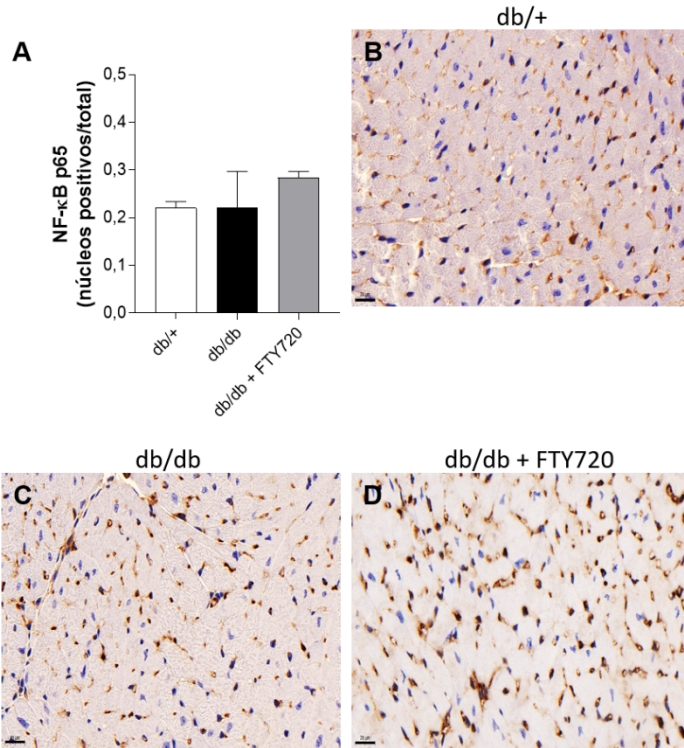


Figura 45. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la proteína NF-κB p65 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

A) Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. B); C) y D) micrografías de miocardio de muestras representativas de la inmunohistoquímica para la detección de NF-κB p65. Las imágenes fueron captadas a 40x de aumento y la escala es 20 μ m.

Ratones db/db_{cat}

La exploración del efecto antiinflamatorio de FTY720/Fingolimod también se llevó a cabo en el modelo de diabetes catabólica.

Al igual que el modelo db/db, los db/db_{cat}, exhibieron signos de inflamación, evidenciados por el aumento significativo en todas las citoquinas medidas; IL-6 (~46 veces; $p < 0,05$), MCP-1 (~2,25 veces; $p < 0,05$) y TNF α (~2,78 veces; $p < 0,05$). Esto último no se vio acompañado de cambios a nivel de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Figura 46).

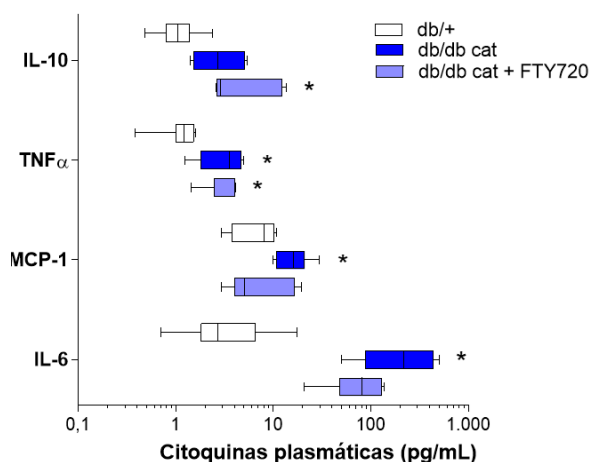


Figura 46. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación sistémica en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

Los resultados se presentan como medianas \pm mínimo y máximo (n=5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

FTY720/Fingolimod ejerció un efecto antiinflamatorio, provocando la disminución significativa de las citoquinas más abundantes en plasma de estos animales; IL-6 (53%) y MCP-1 (44%), de forma que los niveles plasmáticos de estas citoquinas llegaron a ser comparables a las del grupo no diabético. Todo esto acompañado del incremento significativo en los niveles de la citoquina IL-10 (~5,69 veces; $p < 0,05$) en comparación con los del grupo no diabético (Figura 46).

En los miocardios de los ratones db/db_{cat} se detectaron regulaciones al alza en genes de citoquinas proinflamatorias como *Il6* e *Il1b*, así como también en el gen de la citoquina antiinflamatoria *Il10*, en comparación con el grupo no diabético (Figura 47).

Es destacable que los niveles de expresión génica de estas citoquinas fueron mayores a los que reportamos en el fenotipo metabólico.

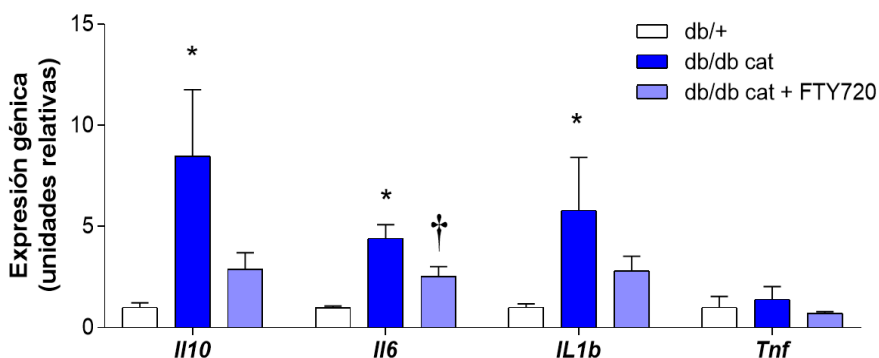


Figura 47. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db_{cat}.

El tratamiento con FTY720/Fingolimod en este modelo de diabetes catabólica, indujo regulación a la baja de los genes de citoquinas proinflamatorias *Il6* e *Il1b* y de la antiinflamatoria *Il10*; las diferencias observadas llegaron a ser similares a las medidas en el grupo no diabético (Figura 47).

El efecto antiinflamatorio de este fármaco también se evaluó mediante el análisis de citoquinas de interés, en tejido miocárdico de los diferentes grupos experimentales (Figura 48).

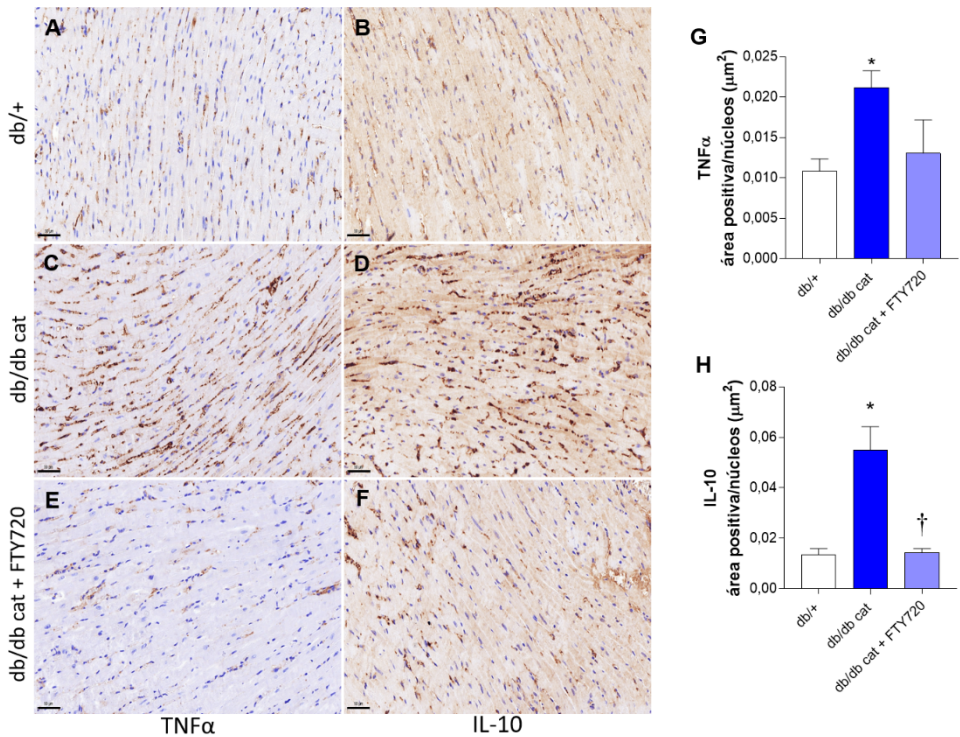


Figura 48. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

Imágenes representativas de miocardio. En A, C y E se muestran imágenes de la tinción mediante inmunohistoquímica de TNFα de los grupos de estudio. En B, D y F se muestran imágenes de la marca de IL-10 de los grupos de estudio. Las imágenes fueron captadas a 20x de aumento y la escala es 50 μm. Los resultados de la cuantificación de la marca de cada citoquina se presentan como medias ± error estándar de la media (n=5 ratones por grupo) en G) TNFα y en H) IL-10. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db_{cat}.

Al igual que lo observado previamente en plasma del modelo catabólico sin tratamiento, los niveles de TNFα en tejido miocárdico estuvieron incrementados de manera significativa (~2 veces; $p < 0,05$), en comparación con los animales del grupo db/+ (Figura 48: G). Esto se

acompañó de un marcado aumento de la citoquina IL-10 (~4,03 veces; $p < 0,05$) en miocardio de los db/db_{cat} respecto a los no diabéticos (Figura 48: H).

En concordancia con el hallazgo del efecto favorable de la administración oral de FTY720/Fingolimod en la inflamación sistémica, se comprobó que el tratamiento también produjo una importante disminución en las citoquinas medidas en miocardio de los animales diabéticos. Esta mejora se dio sobretodo en los niveles de IL-10 (-74%) llegando a ser comparables a los niveles detectados en miocardio del grupo no diabético (Figura 48: G y H).

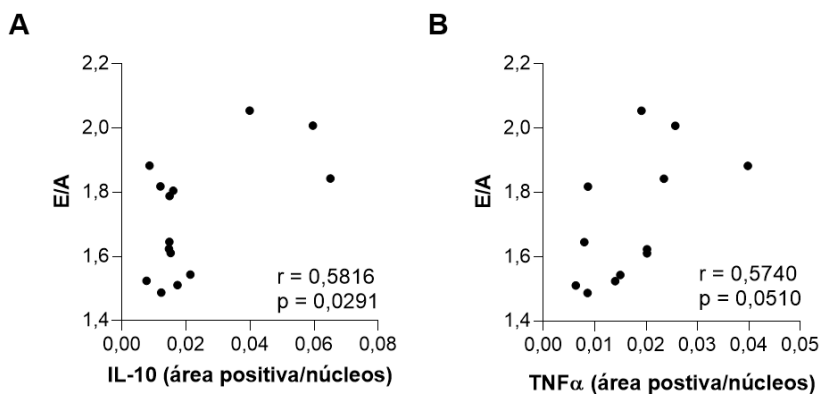


Figura 49. Relación entre el área positiva de IL-10 y TNF α medidas mediante inmunohistoquímica en miocardio y la relación de las ondas E/A (función diastólica) en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

A) Relación directa entre la citoquina antiinflamatoria IL-10 en miocardio y la relación de las ondas E/A de función diastólica en el modelo diabético catabólico (n=14). B) Relación directa entre la citoquina proinflamatoria TNF α en miocardio y la relación de las ondas E/A de función diastólica en el modelo diabético catabólico (n=12). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados, la diferencia se consideró significativa cuando $p < 0,05$.

El efecto antiinflamatorio del fármaco FTY720/Fingolimod en este tejido se correlacionó de manera directa con la relación entre las ondas E y A, uno de los parámetros característicos alterados en los casos de disfunción diastólica (Figura 49).

La determinación de la abundancia relativa de la proteína NF-kB p65 en miocardio del modelo catabólico reveló niveles significativamente aumentados de esta proteína en los animales db/db_{cat} (~1,85 veces; p<0,05) Figura 50), en comparación con los del grupo no diabético.

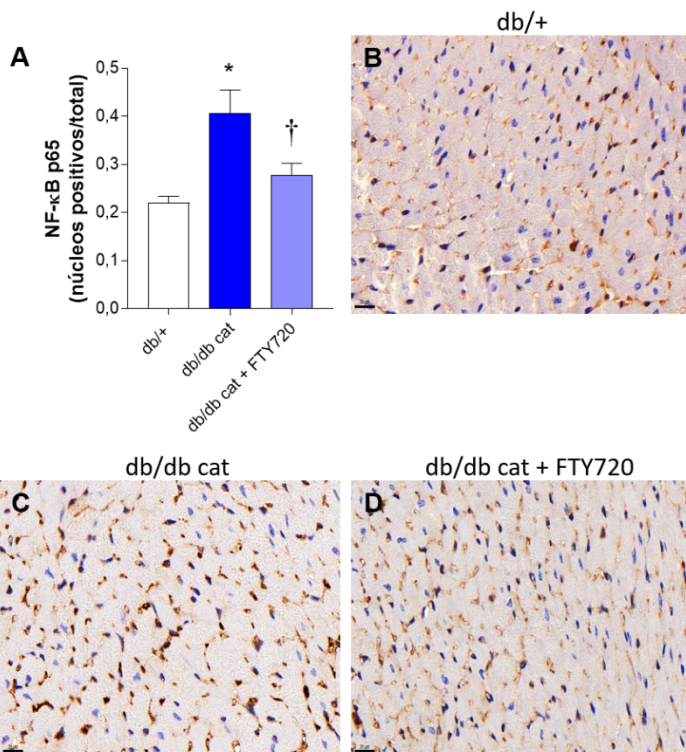


Figura 50. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la proteína NF-kB p65 en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

A) Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando p<0,05 frente al grupo db/+. En concreto, *p<0,05 frente al grupo db/+ y †p<0,05 frente al grupo db/db_{cat}. B); C) y D) micrografías de miocardio de muestras representativas de la inmunohistoquímica para la detección de NF-kB p65. Las imágenes fueron captadas a 40x de aumento y la escala es 20 μ m.

El tratamiento con FTY720/Fingolimod demostró un efecto reductor de los niveles de la proteína NF-kB p65 en miocardio de los diabéticos (~32%; p<0,05) y este cambio resultó ser significativo respecto a los no tratados,

incluso alcanzando niveles similares a los observados en los animales no diabéticos (Figura 50).

Para corroborar este efecto observado en nuestros modelos animales, se empleó otra aproximación mediante técnicas *in vitro* utilizando cardiomiocitos AC16.

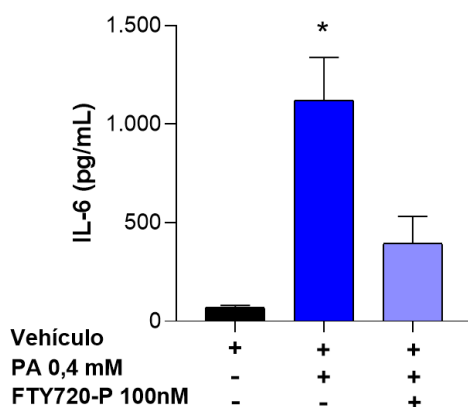


Figura 51. Efecto de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la inflamación en cardiomiocitos AC16 en presencia de PA de FTY720/Fingolimod fosforilado

Los resultados de la determinación de IL-6, mediante ELISA en sobrenadantes de cardiomiocitos AC16 expuestos a PA y FTY720/Fingolimod fosforilado, se presentan como medias \pm error estándar de la media de experimentos independientes ($n=4$). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p<0,05$ frente al grupo vehículo. En concreto, $*p<0,05$ frente al grupo vehículo.

Tras 16 h de exposición al PA, los cardiomiocitos AC16 exhibieron un incremento importante en los niveles de citoquina IL-6, medida en los sobrenadantes del cultivo respecto al grupo expuesto al vehículo (Figura 51). Lo que reveló que el estímulo del PA generó inflamación en las células empleadas.

En presencia de la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod, se intuyó una disminución de los niveles de citoquina IL-6 en sobrenadante del cultivo celular de cardiomiocitos inducidos con PA, aunque esta no alcanzó

niveles significativos. Estos datos sugerirían un posible efecto protector contra la inflamación en estas células. Además, es importante mencionar que se llevaron a cabo intentos para la medición de otra citoquina proinflamatoria, en este caso TNF α , pero los niveles secretados se situaron por debajo del límite de detección del *kit* ELISA empleado.

4.2.3b Efecto del FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis

La apoptosis precede a la muerte celular y a la fibrosis en la disfunción miocárdica³⁰⁴⁻³⁰⁶. Aunque los mecanismos patogénicos que conducen a la CMD están pobremente definidos, se reportó un aumento de la apoptosis en el miocardio de los ratones db/db en comparación con los ratones no diabéticos³⁰⁷. Dado que los ratones db/db son muy resistentes a presentar alteraciones histológicas, como la fibrosis, evaluamos directamente la apoptosis en los corazones de los ratones db/db de ambos grupos diabéticos utilizando el enfoque de la caspasa 3 activada mediante inmunohistoquímica.

Ratones db/db

La presencia de caspasa 3 activada en miocardio del modelo db/db, no mostró diferencias significativas respecto al grupo db/+ (Figura 52). Por su parte, los animales db/db que recibieron el tratamiento con FTY720/Fingolimod, no exhibieron ningún cambio favorable en este marcador de apoptosis.

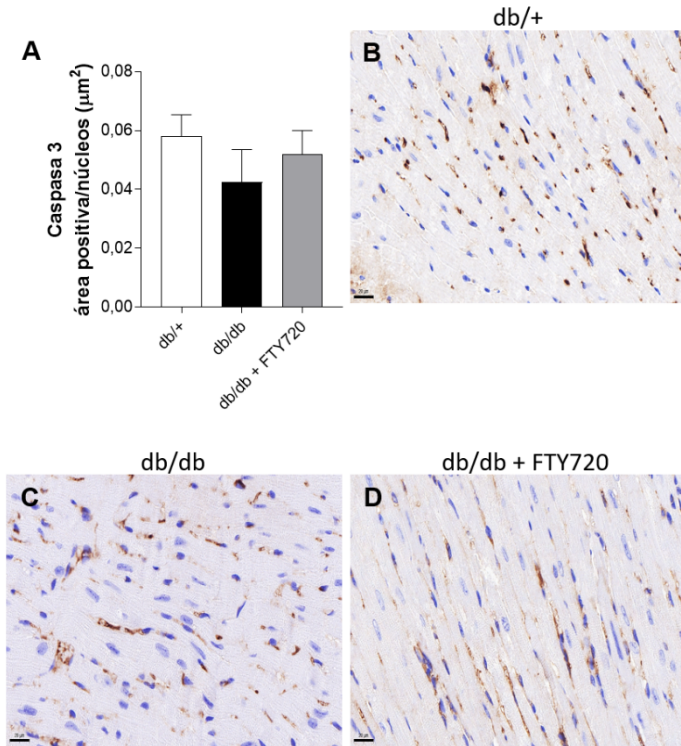


Figura 52. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

A) Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. B); C) y D) micrografías de miocardio de muestras representativas de la inmunohistoquímica para la detección de Caspasa 3 activada. Las imágenes fueron captadas a 40x de aumento y la escala es 20 μ m.

Ratones db/db_{cat}

Los niveles relativos de caspasa 3 activada en las preparaciones de inmunohistoquímica, se mostraron significativamente aumentados respecto a los no diabéticos (Figura 53); revelando signos de apoptosis en este tejido.

La administración de FTY720/Fingolimod redujo significativamente la proporción de células apoptóticas en miocardio de los ratones db/db_{cat}.

tratados en comparación con los no tratados (66%, $p < 0,05$), ejerciendo así un efecto anti-apoptótico en miocardio de estos animales (Figura 53).

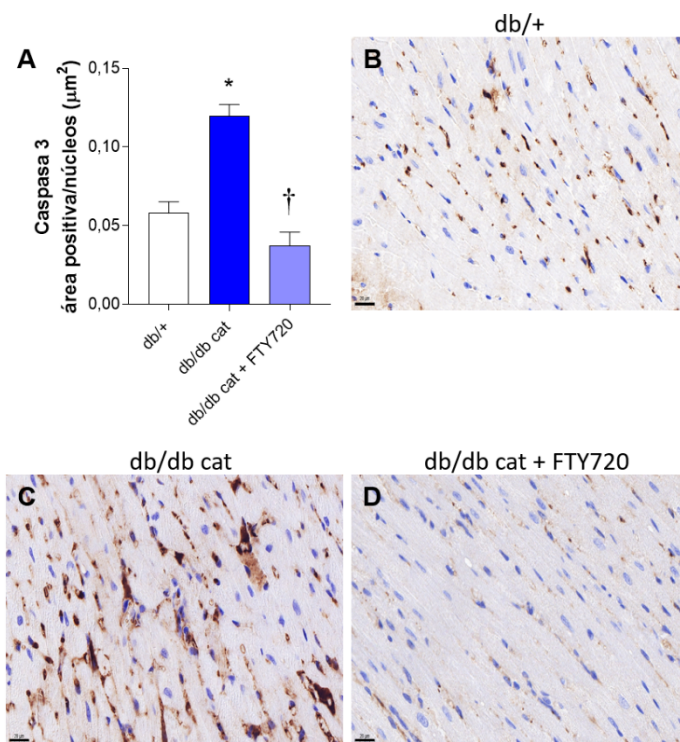


Figura 53. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la apoptosis en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

A) Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media ($n=4-5$ ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA seguida del post-test de Tukey; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+ y † $p < 0,05$ frente al grupo db/db_{cat}. B); C) y D) micrografías de miocardio de muestras representativas de la inmunohistoquímica para la detección de Caspasa 3 activada. Las imágenes fueron captadas a 40x de aumento y la escala es 20 μm .

El efecto favorable en los niveles de caspasa 3 activada en miocardio de estos animales tratados con FTY720/Fingolimod se asoció a la mejora en la funcionalidad cardíaca. En este sentido, se observó una relación directa entre el área positiva de la caspasa 3 activada en miocardios del modelo de diabetes catabólica y la relación entre las ondas E/A, un indicador de disfunción diastólica (Figura 54).

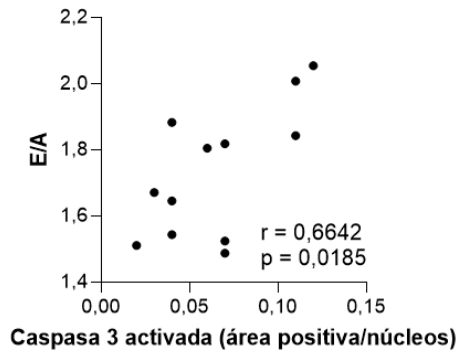


Figura 54. Relación entre el área positiva de caspasa 3 activada en miocardio y la relación de las ondas E/A (función diastólica) en ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}
 Correlación directa entre caspasa 3 activada en miocardio y la relación de las ondas E y A de función diastólica en el modelo diabético catabólico (n=12). Se utilizó una prueba paramétrica de Pearson para analizar si estos parámetros estaban correlacionados, la diferencia se consideró significativa cuando $p < 0,05$.

Otra forma de evaluar el efecto anti-apoptótico de FTY720/Fingolimod fue a través del análisis de apoptosis por citometría de flujo de cardiomiocitos AC16 en presencia de un estímulo negativo, como lo fue el PA. La exposición de cardiomiocitos AC16 a concentraciones elevadas de PA, no provocó un incremento considerable de la fase temprana de apoptosis (Figura 55). En cambio, indujo un porcentaje significativamente aumentado de células en fase de apoptosis tardía, en comparación con las células expuestas al vehículo.

La forma fosforilada del fármaco mostró un efecto protector en la fase tardía de la apoptosis en los cardiomiocitos AC16 expuestos a PA. Este efecto fue revelado por la disminución significativa del porcentaje de células apoptóticas respecto al grupo no tratado con el fármaco (Figura 55).

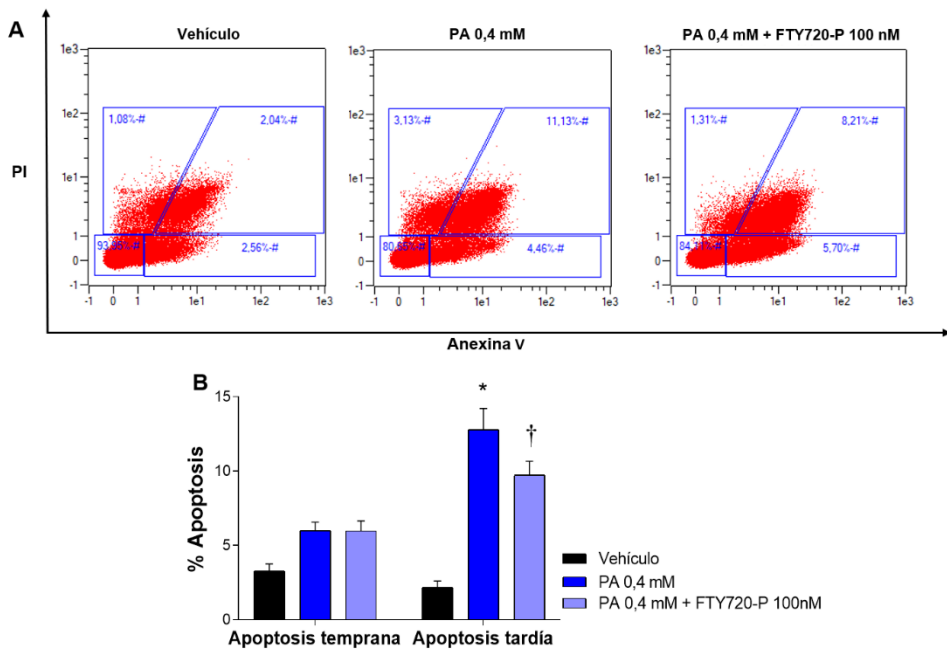


Figura 55. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo en cardiomiocitos AC16 en presencia de PA y de FTY720/Fingolimod fosforilado

A) Imágenes representativas de la citometría de flujo en cardiomiocitos AC16, en presencia del estímulo de PA 0,4mM y la forma fosforilada de FTY720/Fingolimod, tras 12 h de exposición. B) Cuantificación de las células en las diferentes fases de apoptosis, temprana y tardía. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media de ensayos independientes (n=5). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica de ANOVA de dos vías, seguido de post-test de Sidak; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo vehículo. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo vehículo y † $p < 0,05$ frente al grupo PA=0,4mM.

4.2.3c Efecto de FTY720/Fingolimod sobre otros mecanismos fisiopatológicos asociados a la CMD

En una primera exploración de otros mecanismos involucrados en la fisiopatología de la CMD, también abordamos dianas moleculares implicadas en el estrés de RE, estrés oxidativo y función mitocondrial.

Efecto del FTY720/Fingolimod sobre el estrés de RE

Ratones db/db

Los niveles de expresión génica de marcadores de estrés de RE en miocardio de los ratones db/db se muestran en la figura 56.

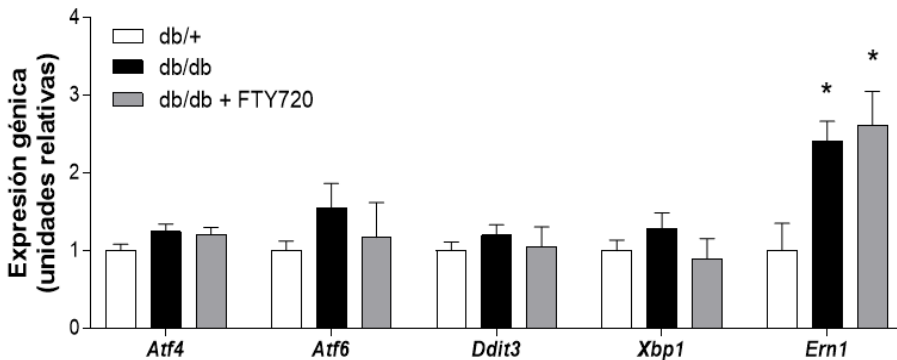


Figura 56. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés de RE en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

No se observaron cambios en los niveles de RNAm de los genes estudiados, en comparación con los no diabéticos; a excepción de la regulación al alza en el gen *Ern1*. No se detectaron diferencias

significativas entre el grupo db/db tratado con FTY720/Fingolimod y los no tratados.

Ratones db/db_{cat}

Es interesante el hallazgo en la condición de diabetes catabólica del aumento de la expresión génica de los marcadores de estrés de RE, aproximadamente el doble en todos los casos, respecto al grupo no diabésico (Figura 57).

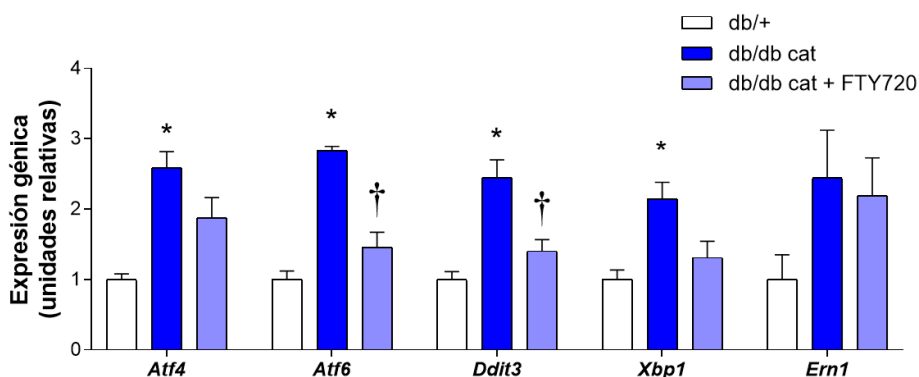


Figura 57. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés de RE en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=4-5 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+ y † $p < 0,05$ frente al grupo diabésico db/db_{cat}.

El tratamiento con FTY720/Fingolimod indujo una regulación a la baja de los genes *Atf6* y *Ddit3*, este último comúnmente relacionado con la apoptosis, en comparación con el grupo db/db_{cat} no tratados.

Efecto del FTY720/Fingolimod sobre el estrés oxidativo

En cuanto a marcadores involucrados al estrés oxidativo evaluamos la expresión génica de *Sod2* y *Cybb* en ambos modelos de DM2.

Ratones db/db

En ninguno de los casos se presentaron diferencias significativas en estas dianas moleculares tanto en el grupo db/db tratado como sin tratar, en comparación con el grupo no diabético (Figura 58).

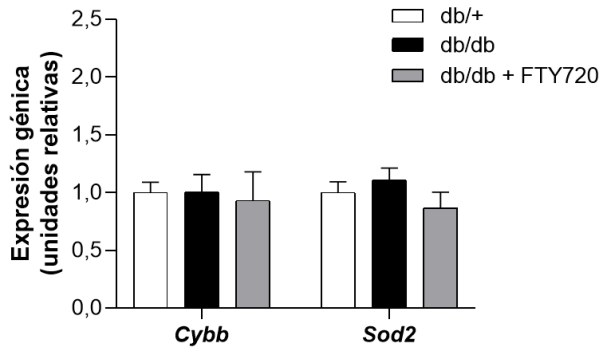


Figura 58. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=7-10 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Ratones db/db_{cat}

En el modelo de diabetes más avanzada se intuyó una tendencia al alza en los niveles relativos de RNAm de *Cybb* respecto al grupo de ratones no diabéticos, aunque no resultara significativo (Figura 59). El grupo de animales tratados con FTY720/Fingolimod no mostró cambios en la expresión de estos genes.

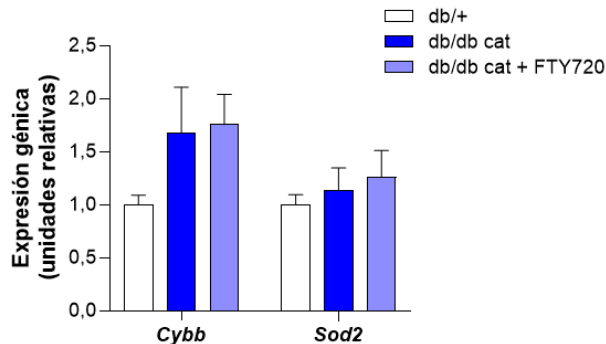


Figura 59. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=7-10 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

Efecto del FTY720/Fingolimod sobre la disfunción mitocondrial

La dinámica de fisión y fusión mitocondrial y mitofagia se encuentran alteradas en DM2³⁰⁸. En este sentido se evaluaron genes implicados en estos procesos.

Ratones db/db

En el modelo db/db el gen *Mnf2* se encontró significativamente regulado al alza respecto a los no diabéticos (Figura 60). Los demás genes explorados permanecieron sin cambios. Sin embargo, el tratamiento con FTY720/Fingolimod provocó una regulación a la baja en la expresión génica de *Dnml1*, *Opa1* y *Mnf1*, en comparación con los diabéticos no tratados.

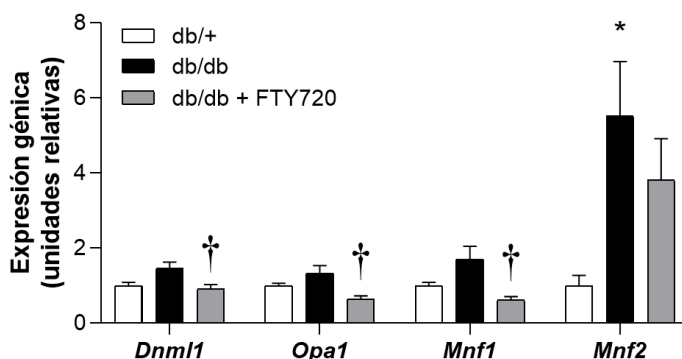


Figura 60. Efecto de 3 meses de de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de función mitocondrial en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=6-9 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba paramétrica ANOVA seguido de post-test de Tukey o una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn, según correspondía al caso; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+. En concreto, * $p < 0,05$ frente al grupo db/+ y † $p < 0,05$ frente al grupo diabético db/db.

Ratones db/db_{cat}

El perfil de expresión génica de dianas de función mitocondrial en el modelo catabólico no mostró cambios significativos (Figura 61); aunque se llegó a intuir un aumento de algunos niveles relativos de RNAm.

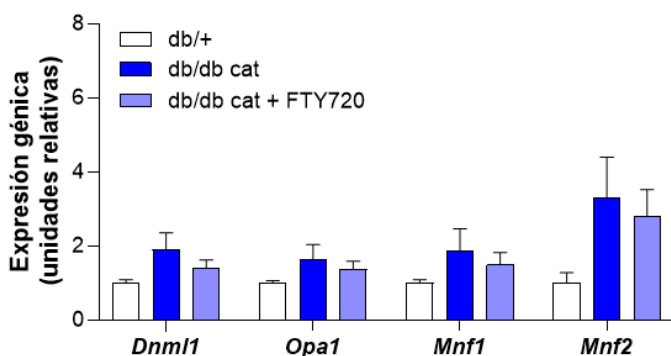


Figura 61. Efecto de 3 meses de la administración de FTY720/Fingolimod sobre la expresión génica de marcadores de función mitocondrial en miocardio de ratones db/+ y diabéticos db/db_{cat}

La expresión génica se normalizó por los niveles de RNAm de GAPDH. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (n=6-9 ratones por grupo). Las

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada variable se determinaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del post-test de Dunn; las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ frente al grupo db/+.

5. DISCUSIÓN

Parte 1. Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD

Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar si lográbamos definir un perfil de esfingolípidos séricos, en particular diferentes especies de ceramidas, relacionados con la disfuncionalidad cardíaca en un modelo animal de CMD ³³. En paralelo también exploramos algunos de los mecanismos involucrados en el remodelado miocárdico que ocurren durante el desarrollo de CMD ¹⁷ en diferentes contextos metabólicos asociados con una señalización alterada a la insulina tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque inicialmente nos propusimos también analizar el posible papel de S1P, una especie esfingolípídica bioactiva con acciones favorables sobre diferentes modelos experimentales de enfermedad cardiovascular ¹⁵⁷, su análisis no pudo ser concluido a tiempo para ser incluido en este trabajo.

Elección del modelo animal de CMD

En este trabajo utilizamos un modelo de ratón *wildtype* db/+ (con fondo genético C57BLKs/J) de prediabetes a través de la inducción con una dieta rica en grasas, de obesidad, intolerancia a la glucosa e insulinoresistencia. El estudio de este modelo se realizó a la luz de resultados previos en sujetos con obesidad a los que se les había identificado signos de cardiomiopatía muy parecidos a los de CMD en modelos experimentales ³⁰⁹⁻³¹³. Los ratones obesos mostraron aumento de la adiposidad e intolerancia a la glucosa; sin embargo, este modelo de prediabetes no desarrolló en nuestro estudio signos de disfunción diastólica, sello ecocardiográfico de la CMD ¹⁷, aunque sí cambios en el remodelado reflejados por alteraciones estructurales del ventrículo izquierdo calculados a partir de la exploración ecocardiográfica de la función sistólica.

Por otro lado, como modelo animal de diabetes y CMD escogimos el ratón db/db (con fondo genético C57BLKs/J) por haber sido previamente reportado que reproducen los signos de cardiomiopatía similares a los de sujetos con DM ³³, siendo esto último confirmado en este estudio. Durante el desarrollo del trabajo, observamos que una parte no despreciable de los ratones db/db, manifestaron un fenotipo significativamente diferente (db/db_{cat}) al esperado para los ratones db/db, al presentar una adiposidad disminuida a pesar de cursar con polidipsia y polifagia. El término “catabólico” se definió como expresión análoga a la utilizada para referirse adelgazamiento provocado en modelos de ratón de DM inducidos por estreptozotocina ³¹⁴. Este hallazgo, según nuestro conocimiento no ha sido reportado previamente. La aparición del fenotipo en estos ratones db/db_{cat} no era *a priori* anticipable y fue probablemente aleatorio, manifestándose en solo un pequeño porcentaje de ratones db/db. Tampoco alcanzamos poderlo explicar por cambios en las condiciones de estabulación, ni su localización, ni a su manipulación, ya que siempre se mantuvieron constantes, o debido a la administración de fármacos (ya que el único fármaco que se administró fue FTY720/Fingolimod disuelto en agua). La consulta directa a la casa comercial que los suministró (Jackson Laboratories) reveló que este fenómeno podía ocurrir en aproximadamente un 10% de esta cepa (jaxpheno17dataset; <https://phenome.jax.org/projects/Jaxpheno17?strainid=162>).

No cabe duda de que la conversión de un fenotipo diabético (db/db) a uno diabético exacerbado (db/db_{cat}), con una adiposidad significativamente reducida en comparación con sus congéneres db/db, generaba un grupo de aspecto y características corporales muy distinto al modelo db/db comúnmente reportado. Como se indicó más arriba, la pérdida de adiposidad en los ratones db/db_{cat} se presentó a pesar de la ausencia de cambios en la ingesta y manteniéndose una concentración plasmática de

ácidos grasos elevada, lo que sugiere que persiste una movilización masiva de triglicéridos del tejido adiposo y posiblemente un metabolismo aumentado de ácidos grasos en tejidos diana de estos animales.

Un aspecto importante que merece ser también resaltado es que todo ello no se vio acompañado de cambios en la hiperglicemia, aunque sí se observó una disminución en los niveles circulantes de insulina en los ratones db/db_{cat} en comparación con los ratones db/db, sugiriendo alteraciones en la secreción de insulina por parte de células β pancreáticas o un aumento en su degradación ³¹⁵.

Como era de esperar, los ratones db/db mostraron disfunción diastólica ³³, a juzgar por los cambios en las ondas atriales E y A y su relación alterada comparado con estas mismas variables en el grupo de referencia (ratones db/+), siendo estos datos similares a los reportados en otros estudios ¹⁸³. Por su parte, un hallazgo importante de este trabajo fue evidenciar que el modelo animal db/db_{cat} también cursó con disfunción diastólica, no difiriendo de la presentada en los db/db. En cuanto al remodelado cardíaco, los animales diabéticos cursaron con disminución del tamaño del ventrículo izquierdo y las dimensiones de sus paredes, mientras que los db/db_{cat} no exhibieron cambios significativos a esos niveles en comparación con los del grupo db/+.

La caracterización de la funcionalidad cardíaca en ambos estadios de la DM (prediabetes y DM2) llevó a continuar con el estudio del efecto del fármaco sólo en el modelo animal db/db.

Ceramidas y manifestación de CMD en ratones db/db

La CMD es una enfermedad cardiometabólica ¹⁷. Las alteraciones metabólicas suelen iniciar su desarrollo y avanzar subclínicamente hasta fases más avanzadas de esta complicación de la DM ¹⁷. Actualmente no existen biomarcadores específicos que permitan un diagnóstico precoz de

la CMD, por lo que la identificación de nuevos candidatos a biomarcadores para su diagnóstico/pronóstico y cuya determinación pueda ser trasladable a la práctica clínica representa un área de investigación prioritaria.

La composición alterada de lípidos circulantes es uno de los factores metabólicos comunes de la DM2 y la enfermedad cardiovascular ³¹⁶. Los ratones db/db (tanto db/db como db/db_{cat}) presentaron un perfil lipídico y lipoproteico diferente del que muestran sus controles no diabéticos (ratones db/+). Los niveles circulantes de colesterol se encontraron aumentados en los dos grupos de ratones db/db (db/db y db/db_{cat}), debido a un aumento en la concentración plasmática de HDL sobretodo en el grupo db/db que además son disfuncionales ³¹⁷, siendo esto último muy probablemente debido a su peor aclaramiento. Es interesante destacar que, ambos grupos de ratones db/db y db/db_{cat}, mostraron una hipertrigliceridemia moderada. La concentración de triglicéridos plasmática se encontró acompañada de una tendencia al aumento de las concentraciones plasmáticas elevadas de ácidos grasos libres en los ratones db/db, probablemente derivadas de una movilización de triglicéridos a través de la activación de la actividad lipasa sensible a las hormonas en respuesta a una señalización a la insulina defectuosa en este tejido. Consistentemente, el contenido de triglicéridos en hígado (determinado mediante RMN) en ratones db/db y marginalmente también en db/db_{cat} se encontró elevado respecto de los ratones db/+. En contraste, si bien también se observó un aumento en el contenido de ácidos grasos libres miocárdicos en ratones db/db, esto no se evidenció en ratones db/db_{cat}. Es posible que, como consecuencia de la exacerbación de la DM ^{318, 319}, el metabolismo de ácidos grasos y por tanto su β -oxidación mitocondrial pudiera estar aumentada en diferentes tejidos diana de estos ratones, incluyendo el hígado además del miocardio. En este contexto, se ha descrito que la abundancia de UCP-2 y de UCP-3 se encuentra significativamente aumentada en miocardio de ratones db/db ³²⁰. Esto

último se relacionó con una ineficiencia en la obtención de ATP a partir de ácidos grasos, conllevando a un daño mitocondrial derivado del incremento de la producción de ROS. Sin embargo, en el presente trabajo no alcanzamos a evaluar la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos. Tampoco evaluamos la expresión génica de estas UCPs. Posiblemente la determinación de cuerpos cetónicos en plasma, como métrica de utilización aumentada de ácidos grasos por el organismo en el modelo de DM exacerbada ³¹⁹, pudiera arrojar más luz en la explicación de estas diferencias entre ambos modelos animales de DM.

El hígado es uno de los principales órganos implicados en la exportación de lípidos, así que podría proponerse que este órgano también pudiera contribuir a los niveles plasmáticos de ceramidas y de otras moléculas lipídicas derivadas ³²¹. Además del hígado, otros tejidos como el tejido adiposo, también ha sido propuesto como que contribuye a los niveles circulantes de ceramidas ¹⁹⁸. Al menos en parte este tejido podría influir en los niveles de ceramidas plasmáticas a través de su secreción en forma de exosomas, tal y como se ha descrito en adipocitos de ratones ob/ob ³²². Este último trabajo representaría uno de los primeros estudios en identificar que los adipocitos también pueden empaquetar y liberar esfingolípidos y ceramidas a la circulación. En nuestro estudio quedó pendiente comprobar si la composición de ceramidas de exosomas aislados directamente de explantes de tejido adiposo coincidiría con el mostrado en el perfil sistémico. Desafortunadamente y por razones técnicas tampoco pudimos analizar exhaustivamente la posible presencia de exosomas en el rango de densidades en que recolectábamos las fracciones lipoproteicas, aisladas por ultracentrifugación a partir de plasma de ratones, por lo que no podríamos descartar que tales exosomas pudieran estar mezclados con las fracciones lipoproteicas aisladas.

Todos los tejidos pueden sintetizar ceramidas, siendo el hígado el principal determinante de las ceramidas circulantes^{200, 323}. La llegada de cantidades elevadas de ácidos grasos saturados movilizadas del tejido adiposo se acompaña de un aumento en el contenido de ceramidas en el hígado y el músculo esquelético¹⁸¹, así como de una señalización de la insulina alterada en esos tejidos^{181, 201, 324-326}. Aunque nuestros datos no sugieren cambios en ninguna de las especies de ceramidas determinadas en hígado, particularmente la Cer 18:0 se encontró relacionada de manera directa con la misma forma ceramídica circulante.

El contenido miocárdico de ceramidas en ratones db/db no difirió de las de ratones db/+; sin embargo, el contenido en ceramidas totales de miocardio de ratones db/db_{cat} se encontró disminuido, sobre todo las de cadena muy larga (Cer 24:0 y Cer 24:1). Los niveles en triglicéridos y ácidos grasos de ese tejido no difirieron de aquellos mostrados en miocardio del grupo db/+. En esta fase del estudio, la explicación de estos datos es compleja, aunque podrían sugerir una disminución de sustrato para la síntesis de ceramidas en ese tejido. Probablemente, la medición de factores que determinan el metabolismo de los sustratos de ceramidas (posiblemente ácidos grasos) ayudaría a esclarecer los mecanismos involucrados. En conjunto estos datos revelaron un fenotipo diferenciado entre ratones db/db y db/db_{cat} también en el metabolismo de ceramidas en tejido miocárdico.

La Cer 18:0 se encontró elevada también en circulación, sobretodo la asociada a HDL. Es interesante destacar que esto último no se asoció con cambios en los niveles totales de ceramidas entre los diferentes grupos, de forma consistente con estudios previos³²¹, apoyando por tanto el concepto de que no todas las ceramidas sino algunas de ellas y/o sus cocientes se relacionarían con el desarrollo de enfermedad cardiovascular³²⁷. Además de utilizar ácidos grasos como sustrato, las ceramidas también pueden ser sintetizadas a partir de la metabolización de la esfingomielina

a través de la acción la enzima esfingomielinasa ³²¹. En nuestro estudio, sin embargo, los niveles relativos circulantes y miocárdicos de la esfingomielina total no cambiaron en ninguno de los dos grupos db/db en comparación con los ratones db/+. Aunque no determinamos directamente la actividad de la enzima esfingomielinasa en ese tejido, en un estudio reciente se reportó que su abundancia relativa está aumentada en tejido adiposo de ratones diabéticos ob/ob ³²⁸. Tampoco analizamos directamente el contenido de esfingomielina en tejido adiposo, pero de confirmarse, los datos del estudio en nuestros ratones db/db quizá sugeriría patrones tejido específico para este esfingolípido en tejidos adiposo y miocárdico.

Los datos de expresión génica de diferentes marcadores de inflamación revelaron que este proceso celular se encontró exacerbado solo en miocardio de ratones db/db_{cat}. Esto último se ha propuesto como otra vía a través de la que podría inducirse la producción de ceramidas ^{202, 329, 330}, por lo que no podríamos descartar la posible implicación de este mecanismo en la modulación del contenido miocárdico de ciertas especies de ceramidas en estos ratones con DM avanzada.

La abundancia relativa de ceramidas miocárdicas puede también modularse por mecanismos relacionados con su catabolismo. Aunque no analizamos la actividad ceramidasa tisular, estudios recientes muestran que el receptor de la adiponectina presenta una actividad ceramidasa intrínseca ^{331, 332} por lo que podría ejercer un papel modulador de los niveles de ceramida en tejidos diana. Este receptor se expresa entre otros tejidos también en hígado y miocardio ³²⁵, por lo que su acción podría verse disminuida ante niveles circulantes disminuidos de adiponectina. Solo los ratones db/db_{cat} mostraron unos niveles disminuidos de adiponectina, sugiriéndose una acción reducida de su receptor y de su actividad ceramidasa en tejidos diana de esos ratones, lo que a su vez podría

promover la acumulación de ceramidas en dichos tejidos. Sin embargo, nuestros datos no apoyarían esta hipótesis, ya que el contenido de ceramidas totales en miocardio de ratones db/db_{cat} se encontró disminuido respecto al de los no diabéticos, sugiriendo que la gestión metabólica de los ácidos grasos podría dirigirse a su catabolismo mitocondrial, en detrimento de una eventual transformación en ceramidas, al menos en tejido miocárdico.

Diferentes estudios prospectivos en humanos muestran la existencia de una asociación entre ciertas ceramidas y el riesgo de DM2. En el estudio Strong Heart, las Cer 16:0, Cer 18:0, Cer 20:0 y Cer 22:0 se asociaron con una mayor resistencia a la insulina ³³³. La relación Cer 18:0/Cer 16:0 se asoció con un mayor riesgo de DM2 en la cohorte FINRISK ³³⁴, lo que sugiere la relación de Cer 18:0 con los precursores de cadena más corta como predictor de la incidencia de DM2. Por tanto, elevaciones en la concentración plasmática de Cer 18:0 se han relacionado con un riesgo elevado de DM2, lo que sugeriría que esta molécula puede estar directamente involucrada en la etiopatología de la DM2 y sus complicaciones ³³⁵. Esta ceramida en particular interfiere con la señalización de insulina y promueve la inflamación inducida por citoquinas ³³⁶.

Las concentraciones de ceramida en plasma predicen también el riesgo de enfermedad cardiovascular ^{166, 220, 221, 337-339}. En este contexto, las ceramidas y sus intermediarios modulan diferentes procesos de señalización se han relacionado con la resistencia a la insulina, lipotoxicidad y la inflamación ^{329, 336, 340, 341}, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel en el desarrollo de CMD ^{185, 342, 343}. En el contexto de la inflamación cabría añadir que al tener el receptor de la adiponectina una acción sensibilizadora a la insulina y anti-inflamatoria ³⁴⁴, la disminución de las concentraciones circulantes de adiponectina en ratones db/db_{cat} podría

exacerbar la inflamación e insulinoresistencia en miocardio de este modelo. Esto último le convierte en una diana terapéutica muy interesante en el tratamiento de la DM y de sus complicaciones. En consonancia con nuestros datos de expresión génica de diferentes dianas de estrés de RE en miocardio de ratones db/db_{cat}, se ha reportado que una señalización disminuida de la adiponectina se relaciona con el desarrollo cardiomiopatía a través de un aumento del estrés de RE en ratones db/db³⁴⁵. En nuestro estudio la alteraciones de mecanismos como la inflamatorio, estrés de RE y también la apoptosis se acompañaron de una función cardíaca empeorada sobretodo en el modelo db/db_{cat}, siendo consistente con estudios previos en los que describe la implicación de estos mecanismos en la CMD^{346, 347}.

Contribución de las lipoproteínas al remodelado miocárdico

Una proporción significativa de los esfingolípidos plasmáticos circulan predominantemente asociados a lipoproteínas³⁴⁸. Se ha sugerido que la presencia aumentada de esfingolípidos en ciertas lipoproteínas, tales como algunas especies de ceramidas podría dotarlas de bioactividad. La concentración de LDL modificadas y en particular de una pequeña fracción de estas, las LDLox, se encuentra frecuentemente aumentada en sujetos diabéticos^{349, 350}, por lo que podrían participar en el desarrollo de CMD³⁵¹.

La fracción de LDL modificadas presenta un alto poder citotóxico a través de la inducción de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis, mecanismos celulares todos ellos relacionados frecuentemente con el remodelado y disfunción cardíacas de origen isquémico³⁵². Sin embargo, su papel en la cardiomiopatía de origen no isquémico está pobremente explorada.

La cinética metabólica de las LDLox circulantes se encontró acelerada en ratones db/db en comparación con los ratones db/+. Adicionalmente la captación de LDLox aumentó en miocardios de ratones db/db. Se ha

sugerido que su captación implica al receptor CD36³⁵³. Consistentemente la inhibición funcional de CD36 con inhibidores específicos disminuyó la captación selectiva de LDLox en cardiomiocitos AC16, del mismo modo que se ha descrito en macrófagos³⁵⁴. A pesar de que la abundancia relativa de los receptores LDLR/LRP1 en miocardio de ratones db/db no difirió de la de los no diabéticos, la inhibición de la captación de LDLox producida por la coincubación con la proteína RAP *in vitro* sugirió su contribución en la captación miocárdica de estas lipoproteínas. En conjunto estos datos apoyarían una captación selectiva de LDLox en miocardio de ratones db/db.

El impacto de las LDLox sobre la apoptosis ha sido ya estudiado en cardiomiocitos³⁵⁵; sin embargo, su contribución añadida a las condiciones de DM2 está menos explorada. Nuestros datos indicaron que la exposición a LDLox promovió *per se* la apoptosis en cardiomiocitos AC16. Este hallazgo fue consistente con un trabajo previo³⁵⁵ según el cual la incubación con LDLox, a la misma concentración que usamos, aumentó la apoptosis tardía en cardiomiocitos de rata neonatal después de 24 h. En contraste con el estudio anterior, en datos previos de nuestro equipo pudimos comprobar además que la adición de LDLnat no promovió apoptosis. Además, las condiciones de DM basadas exclusivamente en la elevación de la concentración de glucosa en el medio no lograron inducir la apoptosis en nuestros cardiomiocitos AC16 (Diarte-Añazco E, datos no publicados). Este hallazgo contrasta con lo reportado en estudios independientes en los que la glucosa elevada promueve la apoptosis, aunque en cardiomiocitos neonatales cultivados³⁵⁶. Nuestros datos son consistentes con otros que muestran que los cardiomiocitos adultos cultivados eran resistentes a desarrollar apoptosis significativa en presencia de concentraciones elevadas de glucosa en el medio²⁵⁶.

La incubación con el PA ya sea solo o combinado con niveles elevados de glucosa, induce la apoptosis en los cardiomiocitos en cultivo ³⁵⁶. En este trabajo, la concentración final de PA utilizada para inducir la apoptosis en diferentes tipos de cardiomiocitos estuvo dentro del rango fisiológico observado en DM2 (150-500 μM) ³⁵⁷⁻³⁶¹.

En nuestro estudio el efecto de la LDLox en combinación con otros estímulos de DM2 (glucosa elevada y PA) exacerbó en gran medida la inducción de la apoptosis tardía en comparación con las condiciones no diabéticas, lo que sugiere la participación de mecanismos alternativos a la apoptosis que conducen a la muerte celular, como la piroptosis o la inflamación ³⁶².

Parte 2. Uso de un análogo estructural de la S1P (FTY720/Fingolimod) para el tratamiento de la CMD

A excepción de los tratamientos convencionales no específicos enfocados en lograr un control glucémico intensificado ³⁶³, no existe ningún otro tratamiento efectivo o específico para frenar la progresión de CMD en sujetos con riesgo aumentado. Aunque la base metabólica de esta complicación no está bien definida, las hipótesis actuales incluyen lipotoxicidad y fibrosis cardíacas, además de la utilización defectuosa de sustratos por parte de los cardiomiocitos, secundaria a una señalización inducida por insulina ²⁷⁹⁻²⁸¹.

FTY720/Fingolimod y disfunción diastólica

Estudios recientes sugieren un papel para FTY720/Fingolimod en el tratamiento de cardiomiopatía de origen vascular isquémico ^{292, 364}. Sin embargo, el posible efecto de este fármaco sobre el remodelado miocárdico y cardiomiopatía lipotóxica característico de la CMD aún no había sido estudiado cuando empezamos este trabajo.

Para este estudio se seleccionaron los ratones db/db, un modelo animal de CMD ³³, a diferencia de los ratones obesos generados tras alimentarlos con una dieta rica en grasas (modelo de prediabetes y resistencia a la insulina), los ratones db/db presentaron signos de disfunción diastólica. Sin embargo, en discordancia con algún estudio previo ^{33, 307} el miocardio de nuestros ratones db/db (i.e., db/db y db/db_{cat}) no mostró signos de hipertrofia, a juzgar por los parámetros estructurales medidos mediante ecocardiografía.

La administración de FTY720/Fingolimod tuvo un efecto favorable en la relación de ondas E y A en ambos grupos de ratones db/db, siendo este hallazgo la principal novedad de nuestro estudio. Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo apareció publicado un estudio donde se reportó por primera vez que FTY720/Fingolimod redujo la progresión de cardiomiopatía hipertrófica generada como consecuencia de una mutación en el gen miocárdico que codifica para en la tropomiosina (Tm-E180G) (ratones Tm-E180G) ²⁸⁹. El tratamiento de estos ratones con FTY720/Fingolimod promovió, como en nuestro caso una mejora en la disfunción diastólica. Además, también se observaron otros efectos favorables, como la prevención parcial del remodelado auricular en ratones tratados con FTY720/Fingolimod. Las mejoras en el remodelado y disfunción cardíaca se atribuyeron a cambios favorables en la abundancia relativa de dos NADPH oxidasas, NOX2 y NOX4, y disminución en la S-glutationalización de la proteína de unión a la miosina cardíaca-C (cMyBP-C), cuya modificación induce la disfunción diastólica. Estos efectos favorables por parte de FTY720/Fingolimod fueron, en parte, explicados por cambios en la señalización de S1P ²⁸⁹. Aunque en dicho estudio no se mostraron los niveles de S1P ni en circulación ni en miocardio, se demostró que la mejora de la disfunción diastólica generada se relacionó con una reducción en los niveles de S1PR1, uno de los principales receptores involucrados en la señalización de S1P ¹⁵⁷, sugiriéndose que

esta podría estar disminuida en ratones Tm-E180G tratados ²⁸⁹. También se han reportado efectos favorables por parte de este fármaco sobre la inflamación miocárdica inducida por infección con coxsackievirus B3 (CVB3) ³⁶⁵.

Como se indicó en la introducción de este trabajo, FTY720/Fingolimod es un fármaco inmunosupresor desarrollado para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Se sintetiza por la modificación química del antibiótico miriocina, purificada a partir del medio de cultivo de *Cordyceps sinensis* (*Ascomycete subtilis*). Como tal se ha identificado como un análogo estructural de la esfingosina, que puede ser fosforilado *in vivo* ³⁶⁶. Tras la administración de FTY720/Fingolimod *in vivo*, la mayor parte de este compuesto se encontró en su forma fosforilada (87%) en circulación; mientras que en miocardio fue un 21%. Este resultado sugeriría que buena parte del fármaco se encuentra fosforilado en circulación y que estaría disponible para actuar en diferentes tejidos diana. En este trabajo quedó pendiente determinar la actividad Sphk2, enzima que predominantemente cataliza la reacción de fosforilación de este fármaco, o en su defecto su expresión génica en hígado de ratones tratados.

Los sujetos con esclerosis múltiple presentan altas tasas de mortalidad comparados con la población general, lo que, al menos en parte, se atribuiría a causas cardiovasculares ³⁶⁷⁻³⁷⁰. Los mecanismos etiopatogénicos y posibles características patológicas relacionadas con el desarrollo de las manifestaciones cardíacas en estos sujetos no son del todo conocidos y podrían ser completamente diferentes a los involucrados en el desarrollo de la CMD. Por otro lado, la fisiopatología de la disfunción cardiovascular en sujetos con esclerosis múltiple es compleja, aunque su desarrollo podría obedecer a fenómenos relacionados con alteraciones en el estrés oxidativo y la función endotelial, además de la disfunción en el

sistema nervioso autónomo cardiovascular y discapacidad física relacionada con el desarrollo de esta condición ³⁷¹⁻³⁷³.

En estudios previos en modelos experimentales se sugirió que la administración de FTY720/Fingolimod protege contra el desarrollo de arteriosclerosis ²⁸³⁻²⁸⁵ y los daños microvasculares inducidos por la DM ²⁸⁶. Consistentemente, también se ha reportado un efecto favorable por parte de FTY720/Fingolimod sobre el desarrollo de IC por causas isquémicas en modelos experimentales ^{157, 287, 288}. Existe cierta controversia en relación con los efectos favorables de FTY720/Fingolimod sobre la incidencia de enfermedad cardiovascular ^{369, 372}.

La experiencia que se tiene de los estudios en humanos a nivel cardiovascular es escasa y la exploración del efecto protector contra el daño miocárdico en sujetos con esclerosis múltiple no ha sido abordada. Así, la posible contribución positiva de este fármaco sobre enfermedades cardíacas no isquémicas, tales como la de CMD, aún no ha sido estudiada.

FTY720/Fingolimod: posibles mecanismos implicados

Nuestros datos sugieren que el desarrollo de CMD en estos ratones db/db se debió a un aumento de inflamación, así como también de estrés de RE y apoptosis miocárdica, siendo ello más aparente en el grupo de ratones db/db_{cat}.

Las acciones celulares favorables atribuidas a FTY720/Fingolimod vienen predominantemente mediadas por S1PRs en miocardio, siendo S1PR1 y S1PR3 los principales en cardiomiocitos ²⁹², y la consiguiente transducción de su señalización ¹⁵⁷. La farmacología de FTY720/Fingolimod y la modulación de S1PR1 es realmente compleja y está pobremente estudiada ³⁷⁴⁻³⁷⁷. Este receptor tiene la capacidad de transducir dos señalizaciones distintas mediadas por diferentes proteínas G, cada una de las cuales promueven a su vez diferentes vías de señalización. S1PR1

está predominantemente acoplada a la proteína Gi para inhibir la producción de ATP, S1PR2 y S1PR3 están principalmente acopladas a proteínas Gi, Gq y G12/13, mientras que S1PR4 y S1PR5 transducen la señalización de S1P a través de las proteínas Gi and G12/13 ³⁷⁸.

Estudios recientes sugieren que a diferencia de la transducción inducida por S1P, según la cual predominaría la señalización acoplada a las proteínas G; la vía de señalización predominante de su análogo estructural lipídico, FTY720/Fingolimod-P, sería a través de la acción de β -arrestina, sobre Gi, la internalización sostenida del receptor, y quizá su degradación proteosomal ^{379, 380}. Se ha sugerido que la degradación del receptor inducida por la β -arrestina tras la unión del fármaco podría ser específico de células del sistema inmune (i.e., linfocitos), aunque no se descarta que esta proteína podría también actuar atenuando la señal en otros tipos celulares, como cardiomiocitos o células endoteliales, cambiando de este modo el balance de activación de ambas vías y, con ello, los efectos favorables atribuidos ^{381 374, 375, 382}.

Las formas S1PR1 y S1PR3 predominan en cardiomiocitos y células endoteliales ³⁸³. En nuestro estudio la expresión génica de *S1pr1* en miocardio solo se encontró aumentada en ratones db/db_{cat}. La administración del fármaco indujo una disminución de la abundancia proteica de este receptor en cardiomiocitos de ratones db/db_{cat} en comparación con la de los mismos ratones no tratados. En cambio, el efecto del fármaco sobre la abundancia relativa de S1PR1 en miocardios de ratones db/db fue más modesta, no alcanzándose diferencias significativas entre tratados con no tratados. Aunque no se pudo comprobar directamente, estos resultados sugerirían que en esos ratones en la vía de acción del fármaco podrían predominar mecanismos de internalización sobre la de atenuación mediada por la β -arrestina.

Estrés oxidativo

El tratamiento con FTY720/Fingolimod protege contra el estrés oxidativo ³⁸⁴. La expresión de NOX2 (i.e., *Cybb*) y superóxido dismutasa mitocondrial (i.e., *Sod2*) son sensores de cambios en el estrés oxidativo celular. Así, las NADPH oxidasas son una fuente de ROS y su expresión suele estar aumentada en cardiomiocitos sometidos a condiciones de estrés oxidativo aumentado ³⁸⁵; mientras que la expresión relativa de *Sod2* está inducida por el estrés oxidativo ³⁸⁶. Sin embargo, los niveles de expresión de ambas no se encontraron afectados en miocardios de nuestros grupos de ratones db/db, si bien en el grupo de ratones db/db_{cat} mostró sólo una tendencia al aumento. Nuestros datos contrastan con los reportados en miocardio hipertrofiado de ratones Tm-E180G tratados ²⁸⁹ y con otro modelo experimental de cardiomiopatía por arresto cardioplégico y *bypass* cardiopulmonar ³⁸⁴, en los que se reportaron cambios favorables en variables relacionadas con el estrés oxidativo. En nuestro caso, la ausencia de diferencias en la expresión génica en miocardio de estos marcadores de estrés oxidativo entre ratones de los grupos db/db y db/+ sugeriría que no se alcanzaron unos niveles de oxidación suficientemente elevados, y por consiguiente no se observó el efecto antioxidante atribuido al fármaco.

Disfunción mitocondrial

Los niveles de expresión de dianas mitocondriales se encontraron aumentadas en miocardios de ratones db/db y de forma marginal en db/db_{cat}. El contenido celular en ceramidas es un determinante de la mitofagia e influye negativamente sobre la β -oxidación mitocondrial ³²⁰. Nuestros datos podrían sugerir una normalización generalizada en la pauta de expresión génica de estos genes en respuesta al tratamiento. Este hallazgo es intrigante y necesitaría ser abordado más exhaustivamente; sin embargo, podría sugerir cambios en la actividad

mitocondrial. No cabe duda de que el posible cambio de contexto metabólico provocado por la administración de FTY720/Fingolimod, sobretudo en los miocardios de ratones db/db justificaría analizar el contenido de ceramidas en ese tejido y quizá también la actividad β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos e indicadores de mitofagia tras el tratamiento con el fármaco o en su defecto abordarlo en cardiomiocitos AC16 incubados en condiciones mimetizantes de la DM2 en presencia de PA.

Inflamación

La administración del fármaco se relacionó con una mejora en el perfil de citoquinas proinflamatorias plasmáticas y también en la de expresión génica de algunas de estas citoquinas en miocardios de los ratones db/db tratados, sugiriendo un efecto antiinflamatorio global en estos ratones. Sin embargo, los cambios en la abundancia relativa de algunas de estas citoquinas en tejido miocárdico solo fueron significativos en ratones db/db_{cat}.

Entre los posibles factores fisiopatogénicos de la CMD, la inflamación es uno de los componentes destacados¹⁷. FTY720/Fingolimod promovió un efecto antiinflamatorio en miocardio de ratones tratados; confirmándose dicho efecto también *in vitro* en cardiomiocitos AC16 expuestos a un ambiente proinflamatorio inducido por la incubación con PA, a través de la disminución de los niveles de IL-6 secretados. Nuestros datos concuerdan con el efecto antiinflamatorio por parte de FTY720/Fingolimod en cardiomiocitos expuestos a condiciones que mimetizan la endotoxemia³⁸⁷. En este contexto, nuestros resultados mostraron que la acción antiinflamatoria por parte de FTY720/Fingolimod se asoció a una inactivación del factor de transcripción NF- κ B en núcleos de cardiomiocitos de ratones db/db_{cat}, bajo cuyo paraguas de regulación se encuentra la expresión de TNF α . Resultados similares muestran que

FTY720/Fingolimod protegió contra la inflamación en cardiomiocitos atenuando la vía de señalización NF- κ B³⁸⁷. Consistentemente, los niveles relativos de TNF α se correlacionaron de manera directa con una mejora en la disfunción cardíaca.

El efecto antiinflamatorio por parte de FTY720/Fingolimod en miocardio de ratones db/db se ha descrito también en un modelo experimental de inflamación miocárdica inducida por infección con CVB3³⁶⁵. En este otro estudio, la inflamación miocárdica se relacionó con mecanismos mediados a través de la señalización de S1PR1 y AKT/caspasa-3 activada, siendo estos procesos desactivados por el fármaco, interfiriendo de este modo en el ciclo de replicación del virus induciendo, por tanto, remisión de la inflamación cardíaca. Datos similares se han encontrado en un modelo independiente de cardiomiopatía inducida por arresto cardioplégico y *bypass* cardiopulmonar en ratas³⁸⁴.

Estrés de retículo endoplasmático y apoptosis

En la DM, las alteraciones en el estrés del RE están asociadas con la apoptosis³⁸⁸. La abundancia relativa de diferentes dianas moleculares de estrés de RE y apoptosis están alterados en ratones db/db³⁸⁹. En nuestro caso, como ejemplo, observamos elevaciones en la expresión génica de *Atf6* (marcador de estrés del RE) concomitantes con elevaciones de *Ddit3* (que codifica para CHOP) uno de los marcadores de apoptosis analizados en este trabajo, sobretudo en miocardios de ratones db/db_{cat}.

El tratamiento con FTY720/Fingolimod redujo la expresión génica relativa de diferentes marcadores de estrés de RE y apoptosis en miocardios de ratones db/db_{cat}. Los datos de expresión génica de las diferentes dianas de estrés de RE y apoptosis analizadas se acompañaron de una reducción concomitante en la abundancia relativa de Caspasa 3 activada en miocardios de ratones db/db_{cat} tratados, lo que se relacionó con una mejora

de la función diastólica. El efecto anti-apoptótico de FTY720/Fingolimod es consistente con el reportado por otros utilizando cardiomiocitos cultivados en condiciones proinflamatorias no relacionadas con DM2 ³⁸⁷. En este sentido, nuestro estudio es el primero en mostrar el efecto favorable del tratamiento con FTY720/Fingolimod contra el desarrollo de apoptosis *in vitro* en cardiomiocitos AC16 en condiciones que mimetizan la DM2.

En otro modelo de cardiomiopatía, el tratamiento con FTY720/Fingolimod activó las vías de señalización Akt/Erk1/2 en miocardio de ratas tratadas, reduciendo no solo los niveles de mediadores inflamatorios, sino también activando proteínas anti-apoptóticas e inhibiendo proteínas proapoptóticas, lo que provocó una reducción del estrés nitrooxidativo y de la apoptosis de los cardiomiocitos ³⁸⁴. Estas mejoras resultaron en una recuperación favorable de las funciones sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo en miocardios de rata inducidos por una perfusión miocárdica extracorpórea.

6. CONCLUSIONES

Parte 1. Contribución del metabolismo de esfingolípidos a la CMD

1. Caracterización fenotípica de los modelos *in vivo* de CMD

[i] El modelo de prediabetes/resistencia a la insulina (ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasas), tras 5 meses de seguimiento, presentó un aumento de la masa de ventrículo izquierdo, reflejando cambios en el remodelado cardíaco, sin signos de disfunción diastólica.

[ii] Un grupo de ratones db/db desarrolló un fenotipo de DM2 más descompensada (ratones db/db_{cat}), manifestándose en una reducción en la concentración de insulina plasmática (respecto del resto de ratones db/db), manteniendo insulinoresistencia y exhibiendo una concentración plasmática de adiponectina disminuida (respecto a los no diabéticos).

[iii] Los modelos animales de DM2 (db/db y db/db_{cat}), después de 4 meses de seguimiento, mostraron signos de disfunción diastólica, definidos por alteraciones en las ondas atriales E y A, así como la relación entre ellas (E/A). Las fracciones de eyección y acortamiento se encontraron preservadas, como es característico de la CMD.

2. Identificación y cuantificación de ceramidas

[i] Los niveles plasmáticos relativos de la ceramida Cer 18:0 se encontraron aumentados en los ratones obesos, mientras que en ambos modelos de DM2 se hallaron elevadas las ceramidas Cer 18:0 y la relación Cer 18:0/Cer 24:0.

[ii] No se observaron cambios en los niveles relativos de ceramidas totales en miocardio de ratones db/db; sin embargo, disminuyeron en el miocardio de ratones db/db_{cat}.

3. Contribución de las LDLox a la CMD en modelos *in vitro* e *in vivo*

[i] La captación de LDLox se vio aumentada en el corazón de los ratones db/db, siendo mediada al menos en parte por CD36 y LDLR/LRP1.

[ii] La incubación de LDLox en cardiomiocitos cultivados en condiciones mimetizantes de DM2 promovió la apoptosis tardía y se correlacionó directamente con el porcentaje de células muertas.

Parte 2. Uso de un análogo estructural de la S1P (FTY720/Fingolimod) para el tratamiento de la CMD

[i] La administración de FTY720/Fingolimod previno, sobretodo a nivel funcional, el desarrollo de la CMD en modelos animales de DM2 (db/db y db/db_{cat}) tras 3 meses de tratamiento.

[ii] El tratamiento con FTY720/Fingolimod en general redujo la abundancia de los receptores S1PR1 en el miocardio de ratones db/db_{cat}, pero no en ratones db/db.

[iii] FTY720/Fingolimod ejerció un efecto antiinflamatorio en ambos modelos animales disminuyendo los niveles circulantes de MCP-1 y TNF α en ratones db/db y de MCP-1 e IL-6 en ratones db/db_{cat}.

[iv] El tratamiento con el fármaco redujo la abundancia de diferentes citoquinas y Nf- κ B p65 en núcleos celulares del miocardio de ratones db/db_{cat}. La concentración de citoquinas en miocardio se correlacionó directamente con la disfunción cardíaca.

[v] FTY720/Fingolimod también influyó favorablemente sobre el desarrollo de apoptosis en el modelo db/db_{cat}, en parte a través de una disminución de la forma activada de la Caspasa 3. Consistentemente, la abundancia relativa de Caspasa 3 activada se correlacionó con una mejora de la función diastólica.

[vi] FTY720/Fingolimod actuó como agente antiinflamatorio y anti-apoptótico en cardiomiocitos humanos AC16, de forma consistente con los hallazgos previamente descritos en ratones db/db.

[vii] La expresión de genes implicados en el estrés de RE se encontraron regulados al alza en el miocardio del modelo db/db_{cat}. El tratamiento con FTY720/Fingolimod mostró una reducción significativa de los mismos.

[viii] La expresión de genes involucrados en la dinámica mitocondrial mostró una tendencia al aumento en miocardio, con el gen *Mnf2* claramente aumentado en los ratones db/db. El tratamiento con FTY720/Fingolimod disminuyó la expresión génica de esos marcadores a niveles cercanos a los que presentaron los ratones no diabéticos.

7. REFERENCIAS

1. National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK) (2008). Type 2 Diabetes: National Clinical Guideline for Management in Primary and Secondary Care (Update). In. London: Royal College of Physicians (UK).
2. International Diabetes Federation. Types of diabetes. Secondary International Diabetes Federation. . In; 2022.
3. Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;89(3):309-19.
4. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan L, Sherry B, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med* 2012;42(6):563-70.
5. Obesity and overweight. In; 2018. p. World Health Organization.
6. Grant B, Sandelson M, Agyemang-Prempeh B, Zalin A. Managing obesity in people with type 2 diabetes. *Clin Med (Lond)* 2021;21(4):e327-e231.
7. Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care* 2011;34(6):1424-30.
8. Dal Canto E, Ceriello A, Ryden L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol* 2019;26(2_suppl):25-32.
9. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112(17):2735-52.
10. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(9):639-660.
11. Formiga F, Camafort M, Carrasco Sanchez FJ. Heart failure and diabetes: The confrontation of two major epidemics of the 21st century. *Rev Clin Esp (Barc)* 2020;220(2):135-138.
12. Lindman BR, Davila-Roman VG, Mann DL, McNulty S, Semigran MJ, Lewis GD, et al. Cardiovascular phenotype in HFpEF patients with or without diabetes: a RELAX trial ancillary study. *J Am Coll Cardiol* 2014;64(6):541-9.
13. Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, Brown JB. Congestive heart failure in type 2 diabetes: prevalence, incidence, and risk factors. *Diabetes Care* 2001;24(9):1614-9.
14. From AM, Leibson CL, Bursi F, Redfield MM, Weston SA, Jacobsen SJ, et al. Diabetes in heart failure: prevalence and impact on outcome in the population. *Am J Med* 2006;119(7):591-9.
15. Fonarow GC, Stough WG, Abraham WT, Albert NM, Gheorghiade M, Greenberg BH, et al. Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a

- report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(8):768-77.
16. Ohkuma T, Komorita Y, Peters SAE, Woodward M. Diabetes as a risk factor for heart failure in women and men: a systematic review and meta-analysis of 47 cohorts including 12 million individuals. *Diabetologia* 2019;62(9):1550-1560.
 17. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 2014;57(4):660-71.
 18. Maisch B, Alter P, Pankuweit S. Diabetic cardiomyopathy--fact or fiction? *Herz* 2011;36(2):102-15.
 19. Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013;34(39):3035-87.
 20. Gotzsche O, Darwish A, Gotzsche L, Hansen LP, Sorensen KE. Incipient cardiomyopathy in young insulin-dependent diabetic patients: a seven-year prospective Doppler echocardiographic study. *Diabet Med* 1996;13(9):834-40.
 21. Rosengren A, Vestberg D, Svensson AM, Kosiborod M, Clements M, Rawshani A, et al. Long-term excess risk of heart failure in people with type 1 diabetes: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3(11):876-85.
 22. Ndumele CE, Cobb L, Lazo M, Bello NA, Shah A, Nambi V, et al. Weight History and Subclinical Myocardial Damage. *Clin Chem* 2018;64(1):201-209.
 23. Rayner JJ, Abdesselam I, d'Arcy J, Myerson SG, Neubauer S, Watkins H, et al. Obesity-related ventricular remodelling is exacerbated in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diagn Ther* 2020;10(3):559-567.
 24. Fumagalli C, Maurizi N, Day SM, Ashley EA, Michels M, Colan SD, et al. Association of Obesity With Adverse Long-term Outcomes in Hypertrophic Cardiomyopathy. *JAMA Cardiol* 2020;5(1):65-72.
 25. Nakamura M, Sadoshima J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. *J Physiol* 2020;598(14):2977-2993.
 26. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12(3):144-53.
 27. Evangelista I, Nuti R, Picchioni T, Dotta F, Palazzuoli A. Molecular Dysfunction and Phenotypic Derangement in Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 2019;20(13).
 28. Borghetti G, von Lewinski D, Eaton DM, Sourij H, Houser SR, Wallner M. Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control. Front Physiol* 2018;9:1514.
 29. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol* 2020;17(9):585-607.
 30. Xu X, Luo Z, He Y, Shan J, Guo J, Li J. Application of untargeted lipidomics based on UHPLC-high resolution tandem MS analysis to profile the lipid

- metabolic disturbances in the heart of diabetic cardiomyopathy mice. *J Pharm Biomed Anal* 2020;190:113525.
31. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2020;17(5):269-285.
 32. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL, Jr. Inflammation in Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2020;75(11):1324-1340.
 33. Riehle C, Bauersachs J. Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2018;114(1):2.
 34. Ritchie RH, Zerenturk EJ, Prakoso D, Calkin AC. Lipid metabolism and its implications for type 1 diabetes-associated cardiomyopathy. *J Mol Endocrinol* 2017;58(4):R225-R240.
 35. Herrero P, Peterson LR, McGill JB, Matthew S, Lesniak D, Dence C, et al. Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(3):598-604.
 36. Varbo A, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol and ischemic heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2014;25(4):266-73.
 37. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004;428(6982):493-521.
 38. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420(6915):520-62.
 39. Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2009;2(9-10):454-66.
 40. Lee WS, Kim J. Application of Animal Models in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J* 2021;45(2):129-145.
 41. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395(6704):763-70.
 42. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996;84(3):491-5.
 43. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 1996;13(1):18-9.
 44. Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;173(1):68-75.
 45. Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B, et al. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet* 1996;12(1):38-43.
 46. Finck BN, Han X, Courtois M, Amond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(3):1226-31.
 47. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, et al. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002;109(1):121-30.
 48. Ussher JR. The role of cardiac lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014;12(3):345-58.

49. Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, et al. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 2002;109(5):629-39.
50. Wright JJ, Kim J, Buchanan J, Boudina S, Sena S, Bakirtzi K, et al. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res* 2009;82(2):351-60.
51. Gambardella J, Lombardi A, Santulli G. Metabolic Flexibility of Mitochondria Plays a Key Role in Balancing Glucose and Fatty Acid Metabolism in the Diabetic Heart. *Diabetes* 2020;69(10):2054-2057.
52. Peterson LR, Herrero P, Coggan AR, Kisrieva-Ware Z, Saeed I, Dence C, et al. Type 2 diabetes, obesity, and sex difference affect the fate of glucose in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;308(12):H1510-6.
53. Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, et al. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation* 2004;109(18):2191-6.
54. Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, et al. Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. *Eur Heart J* 2010;31(1):100-11.
55. Coort SL, Hasselbaink DM, Koonen DP, Willems J, Coumans WA, Chabowski A, et al. Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Diabetes* 2004;53(7):1655-63.
56. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 2007;115(25):3213-23.
57. Riehle C, Abel ED. PGC-1 proteins and heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2012;22(4):98-105.
58. Sugden MC, Holness MJ. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem* 2006;112(3):139-49.
59. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 2005;146(12):5341-9.
60. Hafstad AD, Khalid AM, Hagve M, Lund T, Larsen TS, Severson DL, et al. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor- α activation causes increased fatty acid oxidation, reducing efficiency and post-ischaemic functional loss. *Cardiovasc Res* 2009;83(3):519-26.
61. Kalliora C, Kyriazis ID, Oka SI, Lieu MJ, Yue Y, Area-Gomez E, et al. Dual peroxisome-proliferator-activated-receptor- α / γ activation inhibits SIRT1-PGC1 α axis and causes cardiac dysfunction. *JCI Insight* 2019;5.
62. Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 2005;112(17):2686-95.
63. Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, et al. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct

- evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 2007;56(10):2457-66.
64. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circ J* 2014;78(2):300-6.
 65. Bugger H, Abel ED. Mitochondria in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 2010;88(2):229-40.
 66. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* 2002;277(49):47129-35.
 67. Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, Brodsky I, Geha AS, Massad MG, et al. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(6):H2478-83.
 68. Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 2006;49(6):1434-46.
 69. Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(20):1891-8.
 70. Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O, et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation* 2009;119(9):1272-83.
 71. Boudina S, Han YH, Pei S, Tidwell TJ, Henrie B, Tuinei J, et al. UCP3 regulates cardiac efficiency and mitochondrial coupling in high fat-fed mice but not in leptin-deficient mice. *Diabetes* 2012;61(12):3260-9.
 72. Bugger H, Boudina S, Hu XX, Tuinei J, Zaha VG, Theobald HA, et al. Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3. *Diabetes* 2008;57(11):2924-32.
 73. Bugger H, Chen D, Riehle C, Soto J, Theobald HA, Hu XX, et al. Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice. *Diabetes* 2009;58(9):1986-97.
 74. Bugger H, Riehle C, Jaishy B, Wende AR, Tuinei J, Chen D, et al. Genetic loss of insulin receptors worsens cardiac efficiency in diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52(5):1019-26.
 75. Flarsheim CE, Grupp IL, Matlib MA. Mitochondrial dysfunction accompanies diastolic dysfunction in diabetic rat heart. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 2):H192-202.
 76. How OJ, Aasum E, Severson DL, Chan WY, Essop MF, Larsen TS. Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice. *Diabetes* 2006;55(2):466-73.
 77. Lashin OM, Szweda PA, Szweda LI, Romani AM. Decreased complex II respiration and HNE-modified SDH subunit in diabetic heart. *Free Radic Biol Med* 2006;40(5):886-96.

78. Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2006;55(3):798-805.
79. Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM, Jr., Klein JB, et al. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287(5):E896-905.
80. Boudina S, Abel ED. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:250-8.
81. Hamblin M, Friedman DB, Hill S, Caprioli RM, Smith HM, Hill MF. Alterations in the diabetic myocardial proteome coupled with increased myocardial oxidative stress underlies diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(4):884-95.
82. Turko IV, Murad F. Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats. *J Biol Chem* 2003;278(37):35844-9.
83. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992;256(5057):628-32.
84. Turko IV, Li L, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem* 2003;278(36):33972-7.
85. Anderson EJ, Rodriguez E, Anderson CA, Thayne K, Chitwood WR, Kypson AP. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300(1):H118-24.
86. Gonzalez-Vilchez F, Ayuela J, Ares M, Pi J, Castillo L, Martin-Duran R. Oxidative stress and fibrosis in incipient myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients. *Int J Cardiol* 2005;101(1):53-8.
87. Montaigne D, Marechal X, Coisne A, Debry N, Modine T, Fayad G, et al. Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* 2014;130(7):554-64.
88. Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, et al. Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53(5):1336-43.
89. Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, Weinheimer CJ, et al. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 2005;96(2):225-33.
90. Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, et al. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001;107(7):813-22.
91. Yagyu H, Chen G, Yokoyama M, Hirata K, Augustus A, Kako Y, et al. Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2003;111(3):419-26.
92. Wende AR, Symons JD, Abel ED. Mechanisms of lipotoxicity in the cardiovascular system. *Curr Hypertens Rep* 2012;14(6):517-31.
93. Tsushima K, Bugger H, Wende AR, Soto J, Jenson GA, Tor AR, et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lipotoxic Hearts Induce Post-Translational Modifications of AKAP121, DRP1, and OPA1 That Promote Mitochondrial Fission. *Circ Res* 2018;122(1):58-73.

94. McGavock JM, Lingvay I, Zib I, Tillery T, Salas N, Unger R, et al. Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation* 2007;116(10):1170-5.
95. Ng AC, Delgado V, Bertini M, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Hooi Ewe S, et al. Myocardial steatosis and biventricular strain and strain rate imaging in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2010;122(24):2538-44.
96. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, Hammer S, et al. Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(22):1793-9.
97. Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 2004;18(14):1692-700.
98. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1784-9.
99. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 2003;144(8):3483-90.
100. Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Cooper M, Andreassen M, et al. Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR-alpha activator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(3):H949-57.
101. Tschöpe C, Walther T, Escher F, Spillmann F, Du J, Altmann C, et al. Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. *FASEB J* 2005;19(14):2057-9.
102. Westermann D, Rutschow S, Jäger S, Linderer A, Anker S, Riad A, et al. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes* 2007;56(3):641-6.
103. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, Dhayat N, Schmidt A, Noutsias M, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2007;102(6):500-7.
104. Jadhav A, Tiwari S, Lee P, Ndisang JF. The heme oxygenase system selectively enhances the anti-inflammatory macrophage-M2 phenotype, reduces pericardial adiposity, and ameliorated cardiac injury in diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;345(2):239-49.
105. Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, Jones KE, et al. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes* 2009;58(11):2536-46.
106. Monji A, Mitsui T, Bando YK, Aoyama M, Shigeta T, Murohara T. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305(3):H295-304.
107. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615-25.

108. Bodiga VL, Eda SR, Bodiga S. Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev* 2014;19(1):49-63.
109. Nenna A, Spadaccio C, Lusini M, Ulianich L, Chello M, Nappi F. Basic and Clinical Research Against Advanced Glycation End Products (AGEs): New Compounds to Tackle Cardiovascular Disease and Diabetic Complications. *Recent Adv Cardiovasc Drug Discov* 2015;10(1):10-33.
110. Norton GR, Candy G, Woodiwiss AJ. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Circulation* 1996;93(10):1905-12.
111. Nielsen JM, Kristiansen SB, Norregaard R, Andersen CL, Denner L, Nielsen TT, et al. Blockage of receptor for advanced glycation end products prevents development of cardiac dysfunction in db/db type 2 diabetic mice. *Eur J Heart Fail* 2009;11(7):638-47.
112. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Catalano MG, Vercellinato I, Danni O, et al. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology* 2006;147(12):5967-74.
113. Blackburn NJR, Vulesevic B, McNeill B, Cimenci CE, Ahmadi A, Gonzalez-Gomez M, et al. Methylglyoxal-derived advanced glycation end products contribute to negative cardiac remodeling and dysfunction post-myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2017;112(5):57.
114. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res* 2003;92(7):785-92.
115. Ma H, Li SY, Xu P, Babcock SA, Dolence EK, Brownlee M, et al. Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) up-regulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 2009;13(8B):1751-1764.
116. Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Soetikno V, Nagata M, Nakamura T, et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(2):438-47.
117. Xu J, Wang G, Wang Y, Liu Q, Xu W, Tan Y, et al. Diabetes- and angiotensin II-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death: metallothionein protection. *J Cell Mol Med* 2009;13(8A):1499-512.
118. Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes* 2010;59(8):2033-42.
119. Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, Dong X, Wei J, Qiu C, et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:158.
120. Pandey VK, Mathur A, Kakkar P. Emerging role of Unfolded Protein Response (UPR) mediated proteotoxic apoptosis in diabetes. *Life Sci* 2019;216:246-258.
121. Chowdhry MF, Vohra HA, Galinanes M. Diabetes increases apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: role of

- caspases and poly-adenosine diphosphate-ribose polymerase. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134(1):124-31, 131 e1-3.
122. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000;87(12):1123-32.
 123. Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res* 2006;98(1):119-24.
 124. Bojunga J, Nowak D, Mitrou PS, Hoelzer D, Zeuzem S, Chow KU. Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats. *Diabetologia* 2004;47(12):2072-80.
 125. Huynh K, Kiriazis H, Du XJ, Love JE, Gray SP, Jandeleit-Dahm KA, et al. Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. *Free Radic Biol Med* 2013;60:307-17.
 126. Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* 2001;50(6):1414-24.
 127. Sari FR, Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Zhang S, Muslin AJ, et al. 14-3-3 protein protects against cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis in experimental diabetes. *J Pharmacol Sci* 2010;113(4):325-34.
 128. Wan A, Rodrigues B. Endothelial cell-cardiomyocyte crosstalk in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2016;111(3):172-83.
 129. Choi SY, Chang HJ, Choi SI, Kim KI, Cho YS, Youn TJ, et al. Long-term exercise training attenuates age-related diastolic dysfunction: association of myocardial collagen cross-linking. *J Korean Med Sci* 2009;24(1):32-9.
 130. Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, Levinson GE, Oldewurtel HA, Ahmad MR, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1977;60(4):884-99.
 131. Shimizu M, Umeda K, Sugihara N, Yoshio H, Ino H, Takeda R, et al. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *J Clin Pathol* 1993;46(1):32-6.
 132. Ihm SH, Youn HJ, Shin DI, Jang SW, Park CS, Kim PJ, et al. Serum carboxy-terminal propeptide of type I procollagen (PIP) is a marker of diastolic dysfunction in patients with early type 2 diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 2007;122(3):e36-8.
 133. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes* 2008;57(12):3297-306.
 134. Van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, et al. Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2008;103(4):319-27.
 135. Wang Y, Sun W, Du B, Miao X, Bai Y, Xin Y, et al. Therapeutic effect of MG-132 on diabetic cardiomyopathy is associated with its suppression of proteasomal activities: roles of Nrf2 and NF-kappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(4):H567-78.

136. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, et al. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation* 2000;101(8):899-907.
137. Biernacka A, Cavalera M, Wang J, Russo I, Shinde A, Kong P, et al. Smad3 Signaling Promotes Fibrosis While Preserving Cardiac and Aortic Geometry in Obese Diabetic Mice. *Circ Heart Fail* 2015;8(4):788-98.
138. Bell DS. Diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 2003;26(10):2949-51.
139. Liu JE, Palmieri V, Roman MJ, Bella JN, Fabsitz R, Howard BV, et al. The impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: the Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(7):1943-9.
140. Shivalkar B, Dhondt D, Goovaerts I, Van Gaal L, Bartunek J, Van Crombrugge P, et al. Flow mediated dilatation and cardiac function in type 1 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2006;97(1):77-82.
141. Fontes-Carvalho R, Ladeiras-Lopes R, Bettencourt P, Leite-Moreira A, Azevedo A. Diastolic dysfunction in the diabetic continuum: association with insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2015;14:4.
142. Fang ZY, Schull-Meade R, Leano R, Mottram PM, Prins JB, Marwick TH. Screening for heart disease in diabetic subjects. *Am Heart J* 2005;149(2):349-54.
143. Brunvand L, Fugelseth D, Stensaeth KH, Dahl-Jorgensen K, Margeisdottir HD. Early reduced myocardial diastolic function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus a population-based study. *BMC Cardiovasc Disord* 2016;16:103.
144. Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Strauer BE. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology* 2002;98(1-2):33-9.
145. Zarich SW, Arbuckle BE, Cohen LR, Roberts M, Nesto RW. Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by pulsed Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1988;12(1):114-20.
146. Romanens M, Fankhauser S, Saner B, Michaud L, Saner H. No evidence for systolic or diastolic left ventricular dysfunction at rest in selected patients with long-term type I diabetes mellitus. *Eur J Heart Fail* 1999;1(2):169-75.
147. Christiansen EH, Molgaard H, Christensen PD, Sorensen KE, Christensen CK, Mogensen CE. Increased left ventricular systolic function in insulin dependent diabetic patients with normal albumin excretion. *Eur Heart J* 1998;19(11):1735-9.
148. Fuentes-Antras J, Picatoste B, Gomez-Hernandez A, Egido J, Tunon J, Lorenzo O. Updating experimental models of diabetic cardiomyopathy. *J Diabetes Res* 2015;2015:656795.
149. Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(3):H976-82.
150. Smith CL, Baek ST, Sung CY, Tallquist MD. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circ Res* 2011;108(12):e15-26.

151. Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D. Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1991;68(1):85-9.
152. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation* 2000;101(19):2271-6.
153. Wu MZ, Chen Y, Zou Y, Zhen Z, Yu YJ, Liu YX, et al. Impact of obesity on longitudinal changes to cardiac structure and function in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2019;20(7):816-827.
154. Karason K, Sjostrom L, Wallentin I, Peltonen M. Impact of blood pressure and insulin on the relationship between body fat and left ventricular structure. *Eur Heart J* 2003;24(16):1500-5.
155. Kovilakath A, Jamil M, Cowart LA. Sphingolipids in the Heart: From Cradle to Grave. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:652.
156. Chaurasia B, Summers SA. Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26(10):538-550.
157. Diarte-Anazco EMG, Mendez-Lara KA, Perez A, Alonso N, Blanco-Vaca F, Julve J. Novel Insights into the Role of HDL-Associated Sphingosine-1-Phosphate in Cardiometabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20(24).
158. Welsch CA, Roth LW, Goetschy JF, Movva NR. Genetic, biochemical, and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to the novel immunomodulator FTY720 largely mimic those of the natural sphingolipid phytosphingosine. *J Biol Chem* 2004;279(35):36720-31.
159. Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, et al. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res* 2008;49(8):1621-39.
160. Xia JY, Morley TS, Scherer PE. The adipokine/ceramide axis: key aspects of insulin sensitization. *Biochimie* 2014;96:130-9.
161. Aburasayn H, Al Batran R, Ussher JR. Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016;311(2):E423-35.
162. You Q, Peng Q, Yu Z, Jin H, Zhang J, Sun W, et al. Plasma lipidomic analysis of sphingolipids in patients with large artery atherosclerosis cerebrovascular disease and cerebral small vessel disease. *Biosci Rep* 2020;40(9).
163. Hornemann T, Worgall TS. Sphingolipids and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013;226(1):16-28.
164. Chatterjee S. Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(10):1523-33.
165. Leisher A, Mundlein A, Laaksonen R, Laaperi M, Jylha A, Fraunberger P, et al. Comparison of recent ceramide-based coronary risk prediction scores in cardiovascular disease patients. *Eur J Prev Cardiol* 2022;29(6):947-956.
166. Hilvo M, Meikle PJ, Pedersen ER, Tell GS, Dhar I, Brenner H, et al. Development and validation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *Eur Heart J* 2020;41(3):371-380.
167. Jiang XC, Goldberg IJ, Park TS. Sphingolipids and cardiovascular diseases: lipoprotein metabolism, atherosclerosis and cardiomyopathy. *Adv Exp Med Biol* 2011;721:19-39.

168. Levkau B. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate (S1P). *Handb Exp Pharmacol* 2013(216):147-70.
169. Guitton J, Bandet CL, Mariko ML, Tan-Chen S, Bourron O, Benomar Y, et al. Sphingosine-1-Phosphate Metabolism in the Regulation of Obesity/Type 2 Diabetes. *Cells* 2020;9(7).
170. Brinck JW, Thomas A, Lauer E, Jornayvaz FR, Brulhart-Meynet MC, Prost JC, et al. Diabetes Mellitus Is Associated With Reduced High-Density Lipoprotein Sphingosine-1-Phosphate Content and Impaired High-Density Lipoprotein Cardiac Cell Protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(5):817-24.
171. Kowalski GM, Carey AL, Selathurai A, Kingwell BA, Bruce CR. Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. *PLoS One* 2013;8(9):e72449.
172. Jozefczuk E, Guzik TJ, Siedlinski M. Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology. *Pharmacol Res* 2020;156:104793.
173. Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, et al. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res* 2003;47(5):373-81.
174. Karliner JS. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53(3):189-97.
175. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 2001;40(16):4893-903.
176. D'Angelo G, Uemura T, Chuang CC, Polishchuk E, Santoro M, Ohvo-Rekila H, et al. Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. *Nature* 2013;501(7465):116-20.
177. Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Olivera A, et al. Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):7859-64.
178. Ogawa C, Kihara A, Gokoh M, Igarashi Y. Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem* 2003;278(2):1268-72.
179. Shu H, Peng Y, Hang W, Li N, Zhou N, Wang DW. Emerging Roles of Ceramide in Cardiovascular Diseases. *Aging Dis* 2022;13(1):232-245.
180. Park TS, Hu Y, Noh HL, Drosatos K, Okajima K, Buchanan J, et al. Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J Lipid Res* 2008;49(10):2101-12.
181. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2007;5(3):167-79.
182. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 2011;17(1):55-63.
183. Kim Y, Lim JH, Kim EN, Hong YA, Park HJ, Chung S, et al. Adiponectin receptor agonist ameliorates cardiac lipotoxicity via enhancing ceramide metabolism in type 2 diabetic mice. *Cell Death Dis* 2022;13(3):282.

184. Symons JD, Abel ED. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14(1):59-68.
185. Walls SM, Cammarato A, Chatfield DA, Ocorr K, Harris GL, Bodmer R. Ceramide-Protein Interactions Modulate Ceramide-Associated Lipotoxic Cardiomyopathy. *Cell Rep* 2018;22(10):2702-2715.
186. Hernandez-Corbacho MJ, Salama MF, Canals D, Senkal CE, Obeid LM. Sphingolipids in mitochondria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017;1862(1):56-68.
187. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(2):139-50.
188. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* 2010;62(5):347-56.
189. Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 2004;382(Pt 2):527-33.
190. Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry* 2000;39(22):6660-8.
191. Colombini M. Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability. *J Bioenerg Biomembr* 2017;49(1):57-64.
192. Ganesan V, Perera MN, Colombini D, Datskovskiy D, Chadha K, Colombini M. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis* 2010;15(5):553-62.
193. Gudiz TI, Tserng KY, Hoppel CL. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem* 1997;272(39):24154-8.
194. Ueda N. Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. *Int J Mol Sci* 2015;16(3):5076-124.
195. Law BA, Liao X, Moore KS, Southard A, Roddy P, Ji R, et al. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *FASEB J* 2018;32(3):1403-1416.
196. Parra V, Eisner V, Chiong M, Criollo A, Moraga F, Garcia A, et al. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* 2008;77(2):387-97.
197. Yu J, Novgorodov SA, Chudakova D, Zhu H, Bielawska A, Bielawski J, et al. JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 2007;282(35):25940-9.
198. Chaurasia B, Kaddai VA, Lancaster GI, Henstridge DC, Sriram S, Galam DL, et al. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab* 2016;24(6):820-834.
199. Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297(1):E211-24.
200. Boon J, Hoy AJ, Stark R, Brown RD, Meex RC, Henstridge DC, et al. Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote

- inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* 2013;62(2):401-10.
201. Kolak M, Westerbacka J, Velagapudi VR, Wagsater D, Yetukuri L, Makkonen J, et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes* 2007;56(8):1960-8.
 202. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, Defronzo RA, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 2009;58(2):337-43.
 203. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 1990;265(28):16880-5.
 204. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(13):7522-7.
 205. Brozinick JT, Hawkins E, Hoang Bui H, Kuo MS, Tan B, Kievit P, et al. Plasma sphingolipids are biomarkers of metabolic syndrome in non-human primates maintained on a Western-style diet. *Int J Obes (Lond)* 2013;37(8):1064-70.
 206. Neeland IJ, Singh S, McGuire DK, Vega GL, Roddy T, Reilly DF, et al. Relation of plasma ceramides to visceral adiposity, insulin resistance and the development of type 2 diabetes mellitus: the Dallas Heart Study. *Diabetologia* 2018;61(12):2570-2579.
 207. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Straczkowska S, Kinalska I, Baranowski M, et al. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* 2004;53(5):1215-21.
 208. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273(26):16568-75.
 209. Adams JM, 2nd, Pratipanawat T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 2004;53(1):25-31.
 210. Summers SA, Nelson DH. A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* 2005;54(3):591-602.
 211. Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, et al. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* 1999;93(7):2282-96.
 212. Cinque B, Fanini D, Di Marzio L, Palumbo P, La Torre C, Donato V, et al. Involvement of cPLA2 inhibition in dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21(3):539-51.
 213. Xia JY, Holland WL, Kusminski CM, Sun K, Sharma AX, Pearson MJ, et al. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab* 2015;22(2):266-278.

214. Raichur S, Brunner B, Bielohuby M, Hansen G, Pfenninger A, Wang B, et al. The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach. *Mol Metab* 2019;21:36-50.
215. Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, Mourier A, Brodesser S, Wunderlich CM, et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 2014;20(4):678-86.
216. Hammerschmidt P, Ostkotte D, Nolte H, Gerl MJ, Jais A, Brunner HL, et al. CerS6-Derived Sphingolipids Interact with Mff and Promote Mitochondrial Fragmentation in Obesity. *Cell* 2019;177(6):1536-1552 e23.
217. Turpin-Nolan SM, Hammerschmidt P, Chen W, Jais A, Timper K, Awazawa M, et al. CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep* 2019;26(1):1-10 e7.
218. Bismuth J, Lin P, Yao Q, Chen C. Ceramide: a common pathway for atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2008;196(2):497-504.
219. Magaye RR, Savira F, Hua Y, Kelly DJ, Reid C, Flynn B, et al. The role of dihydrosphingolipids in disease. *Cell Mol Life Sci* 2019;76(6):1107-1134.
220. Peterson LR, Xanthakis V, Duncan MS, Gross S, Friedrich N, Volzke H, et al. Ceramide Remodeling and Risk of Cardiovascular Events and Mortality. *J Am Heart Assoc* 2018;7(10).
221. Meeusen JW, Donato LJ, Bryant SC, Baudhuin LM, Berger PB, Jaffe AS. Plasma Ceramides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38(8):1933-1939.
222. de Carvalho LP, Tan SH, Ow GS, Tang Z, Ching J, Kovalik JP, et al. Plasma Ceramides as Prognostic Biomarkers and Their Arterial and Myocardial Tissue Correlates in Acute Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2018;3(2):163-175.
223. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 2008;29(4):381-402.
224. Lee SY, Kim JR, Hu Y, Khan R, Kim SJ, Bharadwaj KG, et al. Cardiomyocyte specific deficiency of serine palmitoyltransferase subunit 2 reduces ceramide but leads to cardiac dysfunction. *J Biol Chem* 2012;287(22):18429-39.
225. Park TS, Goldberg IJ. Sphingolipids, lipotoxic cardiomyopathy, and cardiac failure. *Heart Fail Clin* 2012;8(4):633-41.
226. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* 2010;59(10):2453-64.
227. Poss AM, Maschek JA, Cox JE, Hauner BJ, Hopkins PN, Hunt SC, et al. Machine learning reveals serum sphingolipids as cholesterol-independent biomarkers of coronary artery disease. *J Clin Invest* 2020;130(3):1363-1376.
228. Glaros EN, Kim WS, Quinn CM, Jessup W, Rye KA, Garner B. Myriocin slows the progression of established atherosclerotic lesions in apolipoprotein E gene knockout mice. *J Lipid Res* 2008;49(2):324-31.
229. Glaros EN, Kim WS, Wu BJ, Suarna C, Quinn CM, Rye KA, et al. Inhibition of atherosclerosis by the serine palmitoyl transferase inhibitor myriocin is

- associated with reduced plasma glycosphingolipid concentration. *Biochem Pharmacol* 2007;73(9):1340-6.
230. Park TS, Rosebury W, Kindt EK, Kowala MC, Panek RL. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces the regression of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic ApoE-deficient mice. *Pharmacol Res* 2008;58(1):45-51.
231. Chaurasia B, Tippetts TS, Mayoral Monibas R, Liu J, Li Y, Wang L, et al. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* 2019;365(6451):386-392.
232. Hla T, Kolesnick R. C16:0-ceramide signals insulin resistance. *Cell Metab* 2014;20(5):703-705.
233. Raichur S, Wang ST, Chan PW, Li Y, Ching J, Chaurasia B, et al. CerS2 Haploinsufficiency Inhibits beta-Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metab* 2014;20(5):919.
234. Vasiliauskaitė-Brooks I, Sounier R, Rochaix P, Bellot G, Fortier M, Hoh F, et al. Structural insights into adiponectin receptors suggest ceramidase activity. *Nature* 2017;544(7648):120-123.
235. Holland WL, Adams AC, Brozinick JT, Bui HH, Miyauchi Y, Kusminski CM, et al. An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab* 2013;17(5):790-7.
236. Edsfeldt A, Duner P, Stahlman M, Mollet IG, Ascitutto G, Grufman H, et al. Sphingolipids Contribute to Human Atherosclerotic Plaque Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(6):1132-40.
237. Testai FD, Kilkus JP, Berdyshev E, Gorshkova I, Natarajan V, Dawson G. Multiple sphingolipid abnormalities following cerebral microendothelial hypoxia. *J Neurochem* 2014;131(4):530-40.
238. Testai FD, Xu HL, Kilkus J, Suryadevara V, Gorshkova I, Berdyshev E, et al. Changes in the metabolism of sphingolipids after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Res* 2015;93(5):796-805.
239. Novgorodov SA, Gudz TI. Ceramide and mitochondria in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53(3):198-208.
240. Chokshi A, Drosatos K, Cheema FH, Ji R, Khawaja T, Yu S, et al. Ventricular assist device implantation corrects myocardial lipotoxicity, reverses insulin resistance, and normalizes cardiac metabolism in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2012;125(23):2844-53.
241. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, Hilvo M, Vihervaara T, Kauhanen D, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J* 2016;37(25):1967-76.
242. Petrocelli JJ, McKenzie AI, Mahmassani ZS, Reidy PT, Stoddard GJ, Poss AM, et al. Ceramide Biomarkers Predictive of Cardiovascular Disease Risk Increase in Healthy Older Adults After Bed Rest. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2020;75(9):1663-1670.
243. Basu R, Oudit GY, Wang X, Zhang L, Ussher JR, Lopaschuk GD, et al. Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(6):H2096-108.
244. Martinez-Abundis E, Correa F, Pavon N, Zazueta C. Bax distribution into mitochondrial detergent-resistant microdomains is related to ceramide and

- cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J* 2009;276(19):5579-88.
245. Russo SB, Baicu CF, Van Laer A, Geng T, Kasiganesan H, Zile MR, et al. Ceramide synthase 5 mediates lipid-induced autophagy and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2012;122(11):3919-30.
 246. Lopez X, Goldfine AB, Holland WL, Gordillo R, Scherer PE. Plasma ceramides are elevated in female children and adolescents with type 2 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013;26(9-10):995-8.
 247. Wigger L, Cruciani-Guglielmacci C, Nicolas A, Denom J, Fernandez N, Fumeron F, et al. Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Rep* 2017;18(9):2269-2279.
 248. Leggat J, Bidault G, Vidal-Puig A. Lipotoxicity: a driver of heart failure with preserved ejection fraction? *Clin Sci (Lond)* 2021;135(19):2265-2283.
 249. Nishi H, Higashihara T, Inagi R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients* 2019;11(7).
 250. Stanley WC, Recchia FA. Lipotoxicity and the development of heart failure: moving from mouse to man. *Cell Metab* 2010;12(6):555-6.
 251. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801(3):311-9.
 252. Schulze PC. Myocardial lipid accumulation and lipotoxicity in heart failure. *J Lipid Res* 2009;50(11):2137-8.
 253. Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the heart. *Curr Hypertens Rep* 2005;7(6):412-7.
 254. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 2006;45(1):42-72.
 255. Nielsen R, Norrelund H, Kampmann U, Kim WY, Ringgaard S, Schar M, et al. Failing heart of patients with type 2 diabetes mellitus can adapt to extreme short-term increases in circulating lipids and does not display features of acute myocardial lipotoxicity. *Circ Heart Fail* 2013;6(4):845-52.
 256. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinass GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes* 2001;50(9):2105-13.
 257. Drosatos K, Bharadwaj KG, Lymperopoulos A, Ikeda S, Khan R, Hu Y, et al. Cardiomyocyte lipids impair beta-adrenergic receptor function via PKC activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300(3):E489-99.
 258. Son NH, Park TS, Yamashita H, Yokoyama M, Huggins LA, Okajima K, et al. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest* 2007;117(10):2791-801.
 259. Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, Ikeda S, Yamashita H, Yagyu H, et al. DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity. *J Biol Chem* 2009;284(52):36312-36323.
 260. Torre-Villalvazo I, Gonzalez F, Aguilar-Salinas CA, Tovar AR, Torres N. Dietary soy protein reduces cardiac lipid accumulation and the ceramide concentration in high-fat diet-fed rats and ob/ob mice. *J Nutr* 2009;139(12):2237-43.
 261. Marino A, Sakamoto T, Robador PA, Tomita K, Levi R. S1P receptor 1-Mediated Anti-Renin-Angiotensin System Cardioprotection: Pivotal Role

- of Mast Cell Aldehyde Dehydrogenase Type 2. *J Pharmacol Exp Ther* 2017;362(2):230-242.
262. Yung BS, Brand CS, Xiang SY, Gray CB, Means CK, Rosen H, et al. Selective coupling of the S1P3 receptor subtype to S1P-mediated RhoA activation and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2017;103:1-10.
263. Zheng S-S, Lu F, Zhang Y, Du J-L, Deng S-B, She Q. The effects of sphingosine-1-phosphate (S1P) and CD69 on the pathogenesis of type 2 diabetes complicated by coronary heart disease. *Int J Clin Exp Med* 2018;11(9):9621-9629
264. Russo SB, Ross JS, Cowart LA. Sphingolipids in obesity, type 2 diabetes, and metabolic disease. *Handb Exp Pharmacol* 2013(216):373-401.
265. Iqbal J, Walsh MT, Hammad SM, Hussain MM. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28(7):506-518.
266. Levkau B. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Front Pharmacol* 2015;6:243.
267. Poti F, Simoni M, Nofer JR. Atheroprotective role of high-density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine-1-phosphate (S1P). *Cardiovasc Res* 2014;103(3):395-404.
268. Srivastava RAK. Dysfunctional HDL in diabetes mellitus and its role in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* 2018;440(1-2):167-187.
269. Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res* 2009;82(2):201-11.
270. Lee MH, Appleton KM, El-Shewy HM, Sorci-Thomas MG, Thomas MJ, Lopes-Virella MF, et al. S1P in HDL promotes interaction between SR-BI and S1PR1 and activates S1PR1-mediated biological functions: calcium flux and S1PR1 internalization. *J Lipid Res* 2017;58(2):325-338.
271. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med* 2005;11(4):418-22.
272. Liu M, Seo J, Allegood J, Bi X, Zhu X, Boudyguina E, et al. Hepatic apolipoprotein M (apoM) overexpression stimulates formation of larger apoM/sphingosine 1-phosphate-enriched plasma high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2014;289(5):2801-14.
273. Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J* 2000;352 Pt 3:809-15.
274. Sattler K, Graler M, Keul P, Weske S, Reimann CM, Jindrova H, et al. Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content: Correction by Sphingosine-1-Phosphate-Loading. *J Am Coll Cardiol* 2015;66(13):1470-85.
275. Brulhart-Meynet MC, Braunersreuther V, Brinck J, Montecucco F, Prost JC, Thomas A, et al. Improving reconstituted HDL composition for efficient post-ischemic reduction of ischemia reperfusion injury. *PLoS One* 2015;10(3):e0119664.
276. Tong X, Peng H, Liu D, Ji L, Niu C, Ren J, et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2

- expression and prostacyclin I-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:27.
277. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res* 2010;85(1):118-26.
278. Ruiz M, Okada H, Dahlback B. HDL-associated ApoM is anti-apoptotic by delivering sphingosine 1-phosphate to S1P1 & S1P3 receptors on vascular endothelium. *Lipids Health Dis* 2017;16(1):36.
279. Lautamaki R, Borra R, Iozzo P, Komu M, Lehtimaki T, Salmi M, et al. Liver steatosis coexists with myocardial insulin resistance and coronary dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(2):E282-90.
280. Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, Esposito A, Belloni E, Ntali G, et al. Increased mediastinal fat and impaired left ventricular energy metabolism in young men with newly found fatty liver. *Hepatology* 2008;47(1):51-8.
281. VanWagner LB, Wilcox JE, Colangelo LA, Lloyd-Jones DM, Carr JJ, Lima JA, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with subclinical myocardial remodeling and dysfunction: A population-based study. *Hepatology* 2015;62(3):773-83.
282. Albuquerque LDS, Damasceno NRT, Maia FN, Carvalho BM, Maia CSC, D'Almeida JAC, et al. Cardiovascular risk estimated in individuals with multiple sclerosis: A case-control study. *Mult Scler Relat Disord* 2021;54:103133.
283. Nofer JR, Bot M, Brodde M, Taylor PJ, Salm P, Brinkmann V, et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2007;115(4):501-8.
284. Keul P, Tolle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, et al. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(3):607-13.
285. Poti F, Costa S, Bergonzini V, Galletti M, Pignatti E, Weber C, et al. Effect of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor agonists FTY720 and CYM5442 on atherosclerosis development in LDL receptor deficient (LDL-R(-)/(-)) mice. *Vascul Pharmacol* 2012;57(1):56-64.
286. Yin Z, Fan L, Wei L, Gao H, Zhang R, Tao L, et al. FTY720 protects cardiac microvessels of diabetes: a critical role of S1P1/3 in diabetic heart disease. *PLoS One* 2012;7(8):e42900.
287. Vessey DA, Li L, Imhof I, Honbo N, Karliner JS. FTY720 postconditions isolated perfused heart by a mechanism independent of sphingosine kinase 2 and different from S1P or ischemic postconditioning. *Med Sci Monit Basic Res* 2013;19:126-32.
288. Egom EE, Ke Y, Musa H, Mohamed TM, Wang T, Cartwright E, et al. FTY720 prevents ischemia/reperfusion injury-associated arrhythmias in an ex vivo rat heart model via activation of Pak1/Akt signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(2):406-14.
289. Ryba DM, Warren CM, Karam CN, Davis RT, 3rd, Chowdhury SAK, Alvarez MG, et al. Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulator,

- FTY720, Improves Diastolic Dysfunction and Partially Reverses Atrial Remodeling in a Tm-E180G Mouse Model Linked to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2019;12(11):e005835.
290. Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S, Hill JA. Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010;7(2):e135-e143.
291. Yang J, Yu Y, Sun S, Duerksen-Hughes PJ. Ceramide and other sphingolipids in cellular responses. *Cell Biochem Biophys* 2004;40(3):323-50.
292. Kurano M, Yatomi Y. Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2018;25(1):16-26.
293. Ferreiros N, Labocha S, Schroder M, Radeke HH, Geisslinger G. LC-MS/MS determination of FTY720 and FTY720-phosphate in murine intracellular compartments and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;887-888:122-7.
294. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34(9):1345-53.
295. Radding CM, Steinberg D. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J Clin Invest* 1960;39:1560-9.
296. Reynolds GD, St Clair RW. A comparative microscopic and biochemical study of the uptake of fluorescent and 125I-labeled lipoproteins by skin fibroblasts, smooth muscle cells, and peritoneal macrophages in culture. *Am J Pathol* 1985;121(2):200-11.
297. Nagy C, Einwallner E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). *J Vis Exp* 2018(131).
298. Barrilero R, Gil M, Amigo N, Dias CB, Wood LG, Garg ML, et al. LipSpin: A New Bioinformatics Tool for Quantitative (1)H NMR Lipid Profiling. *Anal Chem* 2018;90(3):2031-2040.
299. Vinaixa M, Rodriguez MA, Rull A, Beltran R, Blade C, Brezmes J, et al. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *J Proteome Res* 2010;9(5):2527-38.
300. Bui HH, Leohr JK, Kuo MS. Analysis of sphingolipids in extracted human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2012;423(2):187-94.
301. Mi S, Zhao YY, Dielschneider RF, Gibson SB, Curtis JM. An LC/MS/MS method for the simultaneous determination of individual sphingolipid species in B cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016;1031:50-60.
302. Ogiso H, Taniguchi M, Araya S, Aoki S, Wardhani LO, Yamashita Y, et al. Comparative Analysis of Biological Sphingolipids with Glycerophospholipids and Diacylglycerol by LC-MS/MS. *Metabolites* 2014;4(1):98-114.
303. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017;2.
304. Marin-Garcia J. Cell death in the pathogenesis and progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2016;21(2):117-21.

305. Jose Corbalan J, Vatner DE, Vatner SF. Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes? *Basic Res Cardiol* 2016;111(3):31.
306. Gurtl B, Kratky D, Guelly C, Zhang L, Gorkiewicz G, Das SK, et al. Apoptosis and fibrosis are early features of heart failure in an animal model of metabolic cardiomyopathy. *Int J Exp Pathol* 2009;90(3):338-46.
307. Lasheras J, Vila M, Zamora M, Riu E, Pardo R, Poncelas M, et al. Gene expression profiling in hearts of diabetic mice uncovers a potential role of estrogen-related receptor gamma in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Endocrinol* 2016;430:77-88.
308. Rovira-Llopis S, Banuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol* 2017;11:637-645.
309. Alex L, Russo I, Holoborodko V, Frangogiannis NG. Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018;315(4):H934-H949.
310. Xu Z, Qin Y, Lv B, Tian Z, Zhang B. Intermittent Fasting Improves High-Fat Diet-Induced Obesity Cardiomyopathy via Alleviating Lipid Deposition and Apoptosis and Decreasing m6A Methylation in the Heart. *Nutrients* 2022;14(2).
311. Ren J, Wu NN, Wang S, Sowers JR, Zhang Y. Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Physiol Rev* 2021;101(4):1745-1807.
312. Ceylan AF, Wang S, Kandadi MR, Chen J, Hua Y, Pei Z, et al. Cardiomyocyte-specific knockout of endothelin receptor a attenuates obesity cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864(10):3339-3352.
313. Kober F, Soghomonian A, Dutour A. Editorial for "Effect of Obesity on Left Ventricular Remodeling and Clinical Outcome in Chinese Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy Assessed by Cardiac Magnetic Resonance Imaging". *J Magn Reson Imaging* 2022.
314. Daugherty DJ, Marquez A, Calcutt NA, Schubert D. A novel curcumin derivative for the treatment of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 2018;129:26-35.
315. Nonaka Y, Takeda R, Kano Y, Hoshino D. Short-Term Calorie Restriction Maintains Plasma Insulin Concentrations along with a Reduction in Hepatic Insulin-Degrading Enzyme Levels in db/db Mice. *Nutrients* 2021;13(4).
316. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010;53(7):1270-87.
317. Errico TL, Mendez-Lara KA, Santos D, Cabrerizo N, Baila-Rueda L, Metso J, et al. LXR-dependent regulation of macrophage-specific reverse cholesterol transport is impaired in a model of genetic diabetes. *Transl Res* 2017.
318. Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 2014;171(8):2080-90.

319. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15(6):412-26.
320. Murray AJ, Panagia M, Hauton D, Gibbons GF, Clarke K. Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of myocardial uncoupling protein levels. *Diabetes* 2005;54(12):3496-502.
321. Mah M, Febbraio M, Turpin-Nolan S. Circulating Ceramides- Are Origins Important for Sphingolipid Biomarkers and Treatments? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:684448.
322. Flaherty SE, 3rd, Grijalva A, Xu X, Ables E, Nomani A, Ferrante AW, Jr. A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. *Science* 2019;363(6430):989-993.
323. Lightle S, Tosheva R, Lee A, Queen-Baker J, Boyanovsky B, Shedlofsky S, et al. Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice: role of serine-palmitoyl transferase. *Arch Biochem Biophys* 2003;419(2):120-8.
324. Summers SA. Editorial: The Role of Ceramides in Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:667885.
325. Field BC, Gordillo R, Scherer PE. The Role of Ceramides in Diabetes and Cardiovascular Disease Regulation of Ceramides by Adipokines. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:569250.
326. Hsieh CT, Chuang JH, Yang WC, Yin Y, Lin Y. Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle. *Cell Signal* 2014;26(7):1400-8.
327. Hilvo M, Vasile VC, Donato LJ, Hurme R, Laaksonen R. Ceramides and Ceramide Scores: Clinical Applications for Cardiometabolic Risk Stratification. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:570628.
328. Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 2006;55(9):2579-87.
329. Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 2014;510(7503):58-67.
330. Huang H, Kasumov T, Gatmaitan P, Heneghan HM, Kashyap SR, Schauer PR, et al. Gastric bypass surgery reduces plasma ceramide subspecies and improves insulin sensitivity in severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19(11):2235-40.
331. Choi SR, Lim JH, Kim MY, Kim EN, Kim Y, Choi BS, et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon decreased ceramide, and lipotoxicity, and ameliorated diabetic nephropathy. *Metabolism* 2018;85:348-360.
332. Holland WL, Xia JY, Johnson JA, Sun K, Pearson MJ, Sharma AX, et al. Inducible overexpression of adiponectin receptors highlight the roles of adiponectin-induced ceramidase signaling in lipid and glucose homeostasis. *Mol Metab* 2017;6(3):267-275.
333. Fretts AM, Jensen PN, Hoofnagle A, McKnight B, Howard BV, Umans J, et al. Plasma Ceramide Species Are Associated with Diabetes Risk in Participants of the Strong Heart Study. *J Nutr* 2020;150(5):1214-1222.
334. Hilvo M, Salonurmi T, Havulinna AS, Kauhanen D, Pedersen ER, Tell GS, et al. Ceramide stearic to palmitic acid ratio predicts incident diabetes. *Diabetologia* 2018;61(6):1424-1434.

335. Wittenbecher C, Cuadrat R, Johnston L, Eichelmann F, Jager S, Kuxhaus O, et al. Dihydroceramide- and ceramide-profiling provides insights into human cardiometabolic disease etiology. *Nat Commun* 2022;13(1):936.
336. Gaggini M, Ndreu R, Michelucci E, Rocchiccioli S, Vassalle C. Ceramides as Mediators of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiometabolic Disease. *Int J Mol Sci* 2022;23(5).
337. Wang DD, Toledo E, Hruby A, Rosner BA, Willett WC, Sun Q, et al. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevencion con Dieta Mediterranea). *Circulation* 2017;135(21):2028-2040.
338. Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, Kauhanen D, Sylvanne T, Hurme R, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(1):E45-52.
339. Apostolopoulou M, Gordillo R, Koliaki C, Gancheva S, Jelenik T, De Filippo E, et al. Specific Hepatic Sphingolipids Relate to Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Care* 2018;41(6):1235-1243.
340. Chavez JA, Siddique MM, Wang ST, Ching J, Shayman JA, Summers SA. Ceramides and glucosylceramides are independent antagonists of insulin signaling. *J Biol Chem* 2014;289(2):723-34.
341. Bikman BT. A role for sphingolipids in the pathophysiology of obesity-induced inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(13):2135-46.
342. Wang C, Li S, Liu Q, Qian Q, Fu A, Chen L, et al. Ectopic accumulation of ceramide in cardiomyocytes modulates alcoholic cardiomyopathy via the TLR4-dependent pathway. *Alcohol Clin Exp Res* 2022;46(6):1011-1022.
343. Getz GS. The two Cs: ceramide and cardiomyopathy. *J Lipid Res* 2008;49(10):2077-8.
344. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 2012;55(9):2319-26.
345. Dong F, Ren J. Adiponectin improves cardiomyocyte contractile function in db/db diabetic obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17(2):262-8.
346. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol* 2018;68(2):280-295.
347. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2016;65(8):1049-61.
348. Kim EJ, Ramachandran R, Wierzbicki AS. Lipidomics in diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2022;29(2):124-130.
349. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Kume A, et al. Predictive value of circulating oxidized LDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care* 2004;27(3):843-4.
350. Njajou OT, Kanaya AM, Holvoet P, Connelly S, Strotmeyer ES, Harris TB, et al. Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25(8):733-9.
351. Farhangkhoei H, Khan ZA, Barbin Y, Chakrabarti S. Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia* 2005;48(7):1401-10.

352. Trpkovic A, Resanovic I, Stanimirovic J, Radak D, Mousa SA, Cenic-Milosevic D, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015;52(2):70-85.
353. Gnanaguru G, Choi AR, Amarnani D, D'Amore PA. Oxidized Lipoprotein Uptake Through the CD36 Receptor Activates the NLRP3 Inflammasome in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(11):4704-12.
354. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, Kudova E, Cvacka J, Kopecky J, et al. Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J Biol Chem* 2013;288(22):15547-55.
355. Wang X, Sun Y, Yang H, Lu Y, Li L. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes by Modulating the TLR4/NF-kappaB Pathway. *Sci Rep* 2016;6:27866.
356. He Y, Zhou L, Fan Z, Liu S, Fang W. Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by Nacetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis* 2018;9(5):568.
357. Yang L, Guan G, Lei L, Liu J, Cao L, Wang X. Oxidative and endoplasmic reticulum stresses are involved in palmitic acid-induced H9c2 cell apoptosis. *Biosci Rep* 2019;39(5).
358. Yin Z, Zhao Y, He M, Li H, Fan J, Nie X, et al. MiR-30c/PGC-1beta protects against diabetic cardiomyopathy via PPARalpha. *Cardiovasc Diabetol* 2019;18(1):7.
359. Oh CC, Nguy MQ, Schwenke DC, Migrino RQ, Thornburg K, Reaven P. p38alpha mitogen-activated kinase mediates cardiomyocyte apoptosis induced by palmitate. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;450(1):628-33.
360. Mangali S, Bhat A, Udumula MP, Dhar I, Sriram D, Dhar A. Inhibition of protein kinase R protects against palmitic acid-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis through the JNK/NF-kB/NLRP3 pathway in cultured H9C2 cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 2019;120(3):3651-3663.
361. Guan G, Lei L, Lv Q, Gong Y, Yang L. Curcumin attenuates palmitic acid-induced cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes. *Hum Exp Toxicol* 2019;38(6):655-664.
362. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 2019;29(5):347-364.
363. Leung M, Wong VW, Hudson M, Leung DY. Impact of Improved Glycemic Control on Cardiac Function in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Cardiovasc Imaging* 2016;9(3):e003643.
364. Fang R, Zhang LL, Zhang LZ, Li W, Li M, Wen K. Sphingosine 1-Phosphate Postconditioning Protects Against Myocardial Ischemia/reperfusion Injury in Rats via Mitochondrial Signaling and Akt-Gsk3beta Phosphorylation. *Arch Med Res* 2017;48(2):147-155.
365. Wang X, Li M, Yu Y, Liu G, Zou Y, Ge J, et al. FTY720 alleviates coxsackievirus B3-induced myocarditis and inhibits viral replication through regulating sphingosine 1-phosphate receptors and AKT/caspase-3 pathways. *J Cell Physiol* 2019.

366. Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem* 2003;278(48):47408-15.
367. Mincu RI, Magda SL, Mihaila S, Florescu M, Mihalcea DJ, Velcea A, et al. Impaired Cardiac Function in Patients with Multiple Sclerosis by Comparison with Normal Subjects. *Sci Rep* 2018;8(1):3300.
368. Radikova Z, Penesova A, Vlcek M, Havranova A, Sivakova M, Siarnik P, et al. LDL and HDL lipoprotein subfractions in multiple sclerosis patients with decreased insulin sensitivity. *Endocr Regul* 2018;52(3):139-145.
369. Persson R, Lee S, Yood MU, Wagner M, Minton N, Niemcryk S, et al. Incident cardiovascular disease in patients diagnosed with multiple sclerosis: A multi-database study. *Mult Scler Relat Disord* 2020;37:101423.
370. Keytsman C, Eijnde BO, Hansen D, Verboven K, Wens I. Elevated cardiovascular risk factors in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2017;17:220-223.
371. Saroufim P, Zweig SA, Conway DS, Briggs FBS. Cardiovascular conditions in persons with multiple sclerosis, neuromyelitis optica and transverse myelitis. *Mult Scler Relat Disord* 2018;25:21-25.
372. Hilz MJ, Wang R, de Rojas Leal C, Liu M, Canavese F, Roy S, et al. Fingolimod initiation in multiple sclerosis patients is associated with potential beneficial cardiovascular autonomic effects. *Ther Adv Neurol Disord* 2017;10(4):191-209.
373. Rzepinski L, Zawadka-Kunikowska M, Newton JL, Zalewski P, Slomko J. Cardiovascular autonomic dysfunction in multiple sclerosis-findings and relationships with clinical outcomes and fatigue severity. *Neurol Sci* 2022;43(8):4829-4839.
374. Xu Z, Ikuta T, Kawakami K, Kise R, Qian Y, Xia R, et al. Author Correction: Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism. *Nat Chem Biol* 2022;18(3):352.
375. Xu Z, Ikuta T, Kawakami K, Kise R, Qian Y, Xia R, et al. Structural basis of sphingosine-1-phosphate receptor 1 activation and biased agonism. *Nat Chem Biol* 2022;18(3):281-288.
376. Correction for Yu et al., Structural insights into sphingosine-1-phosphate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022;119(34):e2209949119.
377. Yu L, He L, Gan B, Ti R, Xiao Q, Hu H, et al. Structural insights into sphingosine-1-phosphate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022;119(16):e2117716119.
378. Bryan AM, Del Poeta M. Sphingosine-1-phosphate receptors and innate immunity. *Cell Microbiol* 2018;20(5):e12836.
379. Sykes DA, Riddy DM, Stamp C, Bradley ME, McGuinness N, Sattikar A, et al. Investigating the molecular mechanisms through which FTY720-P causes persistent S1P1 receptor internalization. *Br J Pharmacol* 2014;171(21):4797-807.
380. Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem* 2007;282(12):9082-9.

381. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(5):373-86.
382. Bologna Z, Teoh JP, Bayoumi AS, Tang Y, Kim IM. Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling: New Player in Modulating Physiology and Pathology. *Biomol Ther (Seoul)* 2017;25(1):12-25.
383. Alewijnse AE, Peters SL, Michel MC. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites. *Br J Pharmacol* 2004;143(6):666-84.
384. Ahmed N, Mehmood A, Linardi D, Sadiq S, Tessari M, Meo SA, et al. Cardioprotective Effects of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Immunomodulator FTY720 in a Clinically Relevant Model of Cardioplegic Arrest and Cardiopulmonary Bypass. *Front Pharmacol* 2019;10:802.
385. Matsushima S, Sadoshima J. Yin and Yang of NADPH Oxidases in Myocardial Ischemia-Reperfusion. *Antioxidants (Basel)* 2022;11(6).
386. Candas D, Li JJ. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(10):1599-617.
387. Kuai F, Wang L, Su J, Wang Y, Han Y, Zhou S. Exploring the Protective Role and the Mechanism of Sphingosine 1 Phosphate in Endotoxic Cardiomyocytes. *Shock* 2019;52(4):468-476.
388. Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, Akbas EM, Ozcicek A, Onk D, et al. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 2016;144(4):515-524.
389. Wu MX, Wang SH, Xie Y, Chen ZT, Guo Q, Yuan WL, et al. Interleukin-33 alleviates diabetic cardiomyopathy through regulation of endoplasmic reticulum stress and autophagy via insulin-like growth factor-binding protein 3. *J Cell Physiol* 2021;236(6):4403-4419.