

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA



LA ADIPOQUINA DIPEPTIDIL PEPTIDASA 4 (DPP4) COMO INDUCTOR DE SENESCENCIA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ASOCIADAS A ENFERMEDADES METABÓLICAS

Memoria que para optar al título de Doctora en Farmacología y Fisiología
presenta

INÉS VALENCIA FERNÁNDEZ

Directores

Dr. Carlos F. Sánchez Ferrer

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Concepción Peiró Vallejo

Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2022

Este trabajo ha sido subvencionado con las Ayudas para Proyectos I+D+I del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de I+D+I (SAF2017-84776-R y PID2020-115590RB-100/AEI/10.13039/501100011033) y por la concesión de una Ayuda para la Formación de Profesorado Universitario financiada por el Ministerio de Ciencia y Universidades (FPU2016/02612).

A mi Mánuel
A mi madre
A Julián

ÍNDICE

RESUMEN	17
ABSTRACT.....	21
ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	29
1. El avance hacia una sociedad envejecida	31
1.1. La década del envejecimiento saludable	31
1.2. Enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento	32
2. La diabetes como condición progérica	34
2.1. Prevalencia e implicaciones socioeconómicas de la diabetes	34
3. Aspectos comunes entre la diabetes y el envejecimiento	36
4. Diabetes, aterosclerosis y riesgo cardiovascular	38
4.1. Disfunción endotelial.....	39
5. Enfermedades cardiovasculares y envejecimiento vascular prematuro	42
5.1. Aspectos estructurales y funcionales del envejecimiento vascular	42
5.2. Senescencia endotelial y función vascular.....	43
6. Envejecimiento vascular e inflamación: <i>inflammaging</i>	47
6.1. Inflamación crónica de bajo grado.....	47
6.2. El inflammasoma NLRP3.....	48
7. El eje adiposo-vascular	52
7.1. El tejido adiposo como órgano endocrino.....	52
7.2. Adipoquinas, senescencia y disfunción endotelial	55
8. La adipoquina dipeptidil peptidasa-4 (DPP4)	56
8.1. Biosíntesis y estructura de DPP4.....	56
8.2. Funciones de DPP4	58
8.3. sDPP4 y la pared vascular	61
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	63
MATERIALES Y MÉTODOS	67
1. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)	69
2. Ensayo de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia	72
3. Western blot	74

3.1.	Obtención de los extractos proteicos	74
3.2.	Cuantificación de la concentración de proteína por el método de BCA.....	75
3.3.	Electroforesis en gel, transferencia y detección de proteínas.....	77
4.	Determinación de la actividad NADPH oxidasa por quimioluminiscencia...	78
5.	Inmunofluorescencia indirecta	80
5.1.	Detección de <i>foci</i> de γ H2AX y <i>foci</i> de disfunción telomérica (TIFs)	80
5.2.	Determinación de la activación del complejo inflamasoma NLRP3: detección de <i>specks</i> de ASC.....	81
6.	Cuantificación de secreción de citoquinas por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	82
7.	Cohorte de pacientes obesos y no obesos.....	84
7.1.	Recogida de biopsias de epiplon humano y parámetros clínicos.....	84
7.2.	Estudio de la expresión génica en explantes de grasa visceral por RT-qPCR	84
7.3.	Aislamiento de arterias mesentéricas humanas y reactividad vascular	86
8.	Análisis estadístico	89
RESULTADOS		91
PARTE I.....		93
1.	La adipocina sDPP4 induce senescencia en el cultivo de células endoteliales humanas	93
1.1.	sDPP4 aumenta la actividad SA- β -gal e induce la parada del ciclo celular ..	93
1.2.	sDPP4 induce daño en el ADN y disfunción telomérica	96
1.3.	sDPP4 induce el fenotipo secretor senescente en el cultivo de HUVEC	96
2.	El eje PAR2-COX2-TP media la respuesta pro-senescente inducida por sDPP4 en HUVEC.....	98
2.1.	El bloqueo del receptor PAR2 y de la enzima COX-2 previenen la senescencia inducida por sDPP4	98
2.2.	El bloqueo de la enzima NADPH oxidasa con apocinina no previene la senescencia endotelial inducida por sDPP4.....	101
2.3.	La activación del receptor de tromboxano media la senescencia endotelial inducida por sDPP4	103
3.	El inflamasoma NLRP3 está implicado en la senescencia endotelial inducida por sDPP4	107
3.1.	sDPP4 induce el cebado y la activación del inflamasoma NLRP3	107
3.2.	El inflamasoma NLRP3 está implicado en la senescencia endotelial inducida por sDPP4	111

4. La inhibición de la actividad enzimática de DPP4 previenen su efecto pro-senescente <i>in vitro</i>	118
PARTE II	122
1. La adipocina sDPP4 induce disfunción endotelial en arterias mesentéricas humanas	122
1.1. Los inhibidores de DPP4 previenen la inducción de disfunción endotelial <i>ex vivo</i> en arterias mesentéricas humanas	123
1.2. El eje PAR2-COX-2-TP y el inflamasoma NLRP3 median la disfunción endotelial inducida por sDPP4.....	123
PARTE III	126
1. Las arterias mesentéricas de pacientes obesos presentan una función vascular comprometida e inversamente relacionada con su IMC	126
2. La expresión de DPP4 en el tejido visceral se asocia positivamente con una función vascular deteriorada	129
3. La expresión de mediadores pro-senescentes y pro-inflamatorios está aumentada en el tejido visceral de los pacientes obesos	129
4. El bloqueo local de DPP4 y su mecanismo pro-senescente mejora la función endotelial de las arterias mesentéricas en sujetos obesos	132
4.1. La expresión local de DPP4 está asociada positivamente a la expresión de marcadores pro-senescentes en la grasa visceral	132
4.2. El bloqueo local del eje PAR2-COX-2-TP revierte la disfunción endotelial de sujetos obesos <i>ex vivo</i>	132
4.3. El bloqueo local del inflamasoma NLRP3 y de IL-1 β no modifica la función endotelial de sujetos obesos <i>ex vivo</i>	135
4.4. La expresión de DPP4 está asociada positivamente a la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3 en la grasa visceral	135
4.5. La inhibición de DPP4 revierte la disfunción endotelial <i>ex vivo</i> en las microarterias de pacientes obesos	138
DISCUSIÓN	141
CONCLUSIONES	155
CONCLUSIONS	159
REFERENCIAS	163
ANEXOS	185
Anexo 1	187
Anexo 2	189

RESUMEN

La obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), designadas como diabetes cuando ambas enfermedades coexisten, han alcanzado una prevalencia con dimensiones epidémicas a nivel global. La diabetes se considera una condición progerica de acuerdo a los indicadores de envejecimiento vascular prematuro observados en estos pacientes, que ven significativamente deteriorada su función vascular. El envejecimiento vascular es un proceso complejo y multifactorial, caracterizado por modificaciones estructurales de los vasos sanguíneos como el desarrollo temprano de aterosclerosis, un estado de inflamación crónica de bajo grado y la acumulación anómala de células senescentes, que finalmente comprometen la función endotelial. Por todo ello, se requiere identificar nuevas estrategias farmacológicas que frenen el avance del envejecimiento vascular acelerado en la diabetes y así reducir la incidencia de los eventos cardiovasculares, principal causa de mortalidad en estos pacientes.

Una de las características principales de la diabetes es la hipertrofia del tejido adiposo, reconocido como órgano endocrino que libera gran cantidad de sustancias activas denominadas adipocinas. El desequilibrio en la producción de adipocinas dañinas en detrimento de las beneficiosas afecta directamente a la función vascular, debido a la estrecha conexión estructural y funcional establecida entre el tejido adiposo y la vasculatura. La adipocina dipeptidil peptidasa 4 (sDPP4) ha sido identificada recientemente como uno de los mediadores liberados por el tejido adiposo y cuyos niveles sistémicos están aumentados en los pacientes obesos y diabéticos. Además, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que sDPP4 puede ejercer efectos deletéreos sobre la pared vascular, aunque su implicación en el proceso de envejecimiento vascular acelerado no ha sido explorada hasta la fecha. Así, el objetivo principal de la presente tesis doctoral fue determinar el posible papel desempeñado por la adipocina sDPP4 en el envejecimiento vascular prematuro que se observa en el contexto patológico de la diabetes, analizando su capacidad para inducir senescencia y disfunción endotelial *in vitro*, así como su implicación en la función vascular de una cohorte de pacientes obesos. Adicionalmente, se ha estudiado el posible beneficio de los inhibidores de DPP4 (gliptinas) en el bloqueo de estos efectos.

En este estudio se ha demostrado que sDPP4 induce senescencia en células endoteliales humanas en cultivo, determinada por el aumento de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia, el daño en el ADN y la expresión de mediadores pro-senescentes de parada del ciclo celular. Siguiendo un mecanismo molecular común, también se ha observado que

Resumen

sDPP4 deteriora la relajación dependiente de endotelio de arterias de resistencia humanas. En el endotelio, DPP4 activa el receptor metabotrópico PAR2, la actividad ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la producción de TXA₂ actuando sobre el receptor TP (eje PAR2-COX-2-TP), que convergen en la activación del inflammasoma NLRP3 y la producción de IL-1 β . En los pacientes obesos, que presentaban hiperglucemia e hipertensión, se observó además una función endotelial deteriorada en comparación con el grupo de pacientes control. Se ha determinado que la disfunción endotelial en los pacientes obesos correlaciona positivamente con el índice de masa corporal y con la expresión aumentada de DPP4 y de marcadores pro-senescentes y proinflamatorios en el tejido adiposo visceral que rodea a las arterias de resistencia. Cuando se bloqueó farmacológicamente la actividad enzimática de DPP4 o el mecanismo pro-senescente que induce DPP4 *in vitro*, la disfunción endotelial de los pacientes obesos fue revertida hasta niveles observados en pacientes sanos. En conjunto, estos resultados presentan a DPP4 como un mediador relevante del envejecimiento vascular prematuro en el contexto de la obesidad humana. La hipótesis que se plantea es que DPP4 es un nuevo factor que conectaría la respuesta senescente desde la grasa al deterioro de la pared vascular.

El interés en DPP4 como diana farmacológica se inició con el uso clínico de las gliptinas en el control de la glucemia en pacientes con DMT2. A la luz de los resultados de esta tesis doctoral, sDPP4 surge como un inductor de la senescencia de las células endoteliales humanas y la disfunción endotelial asociadas a la diabetes. Así, el espectro de aplicación terapéutica de las gliptinas podría ampliarse a la preservación de la función endotelial y el retraso del envejecimiento vascular prematuro en el contexto de las enfermedades cardiometabólicas.

ABSTRACT

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM), which are referred to as “diabesity” when both coexist, have reached epidemic proportions globally. Diabesity is considered a progeric condition according to the accelerated vascular aging displayed by these patients, whose vascular function is significantly impaired. Vascular aging is a complex and multifaceted process, characterized by a plethora of structural modifications in blood vessels that accounts for early atherosclerosis, low-grade chronic inflammation state and abnormal accumulation of senescent cells leading a compromised vascular function. In this context, new pharmacological strategies are required to delay early vascular aging in diabesity and so reduce the incidence of cardiovascular events, main cause of mortality in these patients.

One of the main characteristics of diabesity is the enlargement of the adipose tissue, acknowledged as a true endocrine organ that secretes a vast amount of active substances called adipokines. The imbalanced production of detrimental adipokines above beneficial ones directly affects vascular functionality, due to the close structural and functional connexion established between the adipose tissue and the vessel wall. The adipokine dipeptidyl peptidase a (sDPP4) has been recently identified as one of the mediators released by the adipose tissue, whose plasmatic levels are enhanced in obesity and T2DM patients. Furthermore, former studies done in our laboratory demonstrated that sDPP4 can exert harmful effects in the vasculature, albeit its role in accelerated vascular aging has not been explored. The main objective in this thesis was to determine the function of sDPP4 in the diabesity-associated early vascular aging, analysing whether it can induce endothelial senescence and dysfunction, and to what extent sDPP4 is involved in the vascular function of a cohort of obese patients. Additionally, the possible benefit of DPP4 inhibitors (gliptins) blocking such effects has been explored.

In this study, we have demonstrated that sDPP4 triggers senescence in cultured human endothelial cells, ascertained by an increased senescence-associated β -galactosidase activity, DNA damage and overexpression of pro-senescent markers related to cell cycle arrest. Through a common molecular mechanism, it has been also observed that sDPP4 impairs the endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries. In the endothelium, DPP4 activates the metabotropic receptor PAR2, the activity of cyclooxygenase 2 (COX-2) and the production of TXA₂ acting over TP receptors (PAR2-COX-2-TP axis), leading to the activation of NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. In obese patients exhibiting hyperglycaemia and hypertension, we also showed an impaired microarterial functionality in comparison to

Abstract

control non-obese counterparts. Importantly, we observed that endothelial dysfunction in obese patients was positively associated with the body mass index and a greater expression of DPP4 and pro-senescent and pro-inflammatory markers in the visceral adipose tissue nearby the resistance arteries. When DPP4 enzymatic activity or sDPP4-induced pro-senescent mechanism was pharmacologically inhibited, endothelial dysfunction of obese patients was restored back to levels of healthy subjects. Together, these results reveals DPP4 as a relevant mediator in the early vascular aging in the context of human obesity. Our hypothesis is that DPP4 is a new factor connecting the senescent response from the adipose tissue to the vascular wall.

The interest on DPP4 as a pharmacological target began with the clinical use of gliptins in the glycaemic control of T2DM patients. In light of our results, sDPP4 arises as relevant mediator promoting human endothelial cell senescence and endothelial dysfunction associated with diabetes. Thus, the spectrum of therapeutic application of gliptins could be broaden to the preservation of endothelial function and delay of early vascular aging in the cardiometabolic diseases.

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos

ADA: adenosina deaminasa

ADCP2: proteína acomplejante de la adenosina deaminasa 2

ASC: proteína formadora de *specks* asociada a apoptosis con dominio CARD

ATP: adenosín trifosfato

BCA: método del ácido bicinconínico

BK: bradiquinina

BNP: péptido natriurético cerebral

BSA: albúmina sérica bovina

CARD: dominio de reclutamiento de caspasa

Cav-1: caveolina-1

CCL5: ligando 5 de quimioquinas

CD26: *cluster* de diferenciación 26

CDK: quinasa dependiente de ciclinas

CLR: receptor de lectina tipo C

CMLVH: células de músculo liso vascular humano

COX: ciclooxigenasa

DALYs: años de vida ajustados por discapacidad (*disability-adjusted life years*)

DAMP: patrón molecular asociado a daño

DAPI: 4'-6'-diamidino-2-fenilindol

DDR: respuesta al daño en el ADN

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

DPP4: dipeptidil peptidasa 4

ECGS: factor de crecimiento endotelial

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EGTA: ácido etilenglicol tetraacético

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial

ET-1: endotelina 1

FCS: suero fetal bovino

GBD: informe de carga global de enfermedades (*Global Burden of Disease Report*)

GHED: base de datos sobre el gasto global en salud (*Global Health Expenditure Database*)

GSDMD: gasdermina D

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HRP: peroxidasa de rábano

hsCRP: proteína C reactiva de alta sensibilidad

HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

IAP-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1

IAPP: polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular

IL: interleuquina

Abreviaturas

IMC: índice de masa corporal

INF- γ : interferón gamma

KH: solución Krebs-Henseleit

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido

LRR: dominio rico en repeticiones de leucina

M6PR: receptor de manosa-6-fosfato

MAPK: quinasas activadas por mitógenos

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MMP: metaloproteinasas

NEFA: ácido graso no esterificado

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

NO: óxido nítrico

NOD: dominio de oligomerización de nucleótidos

NLR: receptores similares al dominio de oligomerización y unión a nucleótidos

NLRP3: receptor de tipo NOD asociado a criopirina 3

NOS: óxido nítrico sintasa

O₂⁻: superóxido

ODS: objetivos de desarrollo sostenible

ONOO⁻: peroxinitrito

PA: presión arterial

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

PAR2: receptor activado por proteinasas 2

pEC50: logaritmo de la concentración media efectiva

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfato

PBS: tampón fosfato salino

PRR: receptor de reconocimiento de patrones

PVDF: fluoruro de polivinilideno

PYD: dominio pirina

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT: retrotranscripción

SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia

SDF1- α : factor derivado de células estromales 1 alpha

sDPP4: dipeptidil peptidasa 4 soluble

SDS: dodecilsulfato sódico

SIRT: sirtuina

SNP: nitroprusiato sódico

TIFs: *foci* de disfunción telomérica

TLR: receptor de tipo *toll*

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alpha

TRF-1: factor de unión a repeticiones teloméricas

TXA₂: tromboxano A2

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular

X-gal: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

1. El avance hacia una sociedad envejecida

1.1. La década del envejecimiento saludable

La población mundial está envejeciendo a un ritmo acelerado, con un aumento de la esperanza de vida de hasta 5,5 años de media para ambos sexos desde el año 2000 (Organización Mundial de la Salud, 2019). Esto implica que, a día de hoy, hay más de 1000 millones de personas en todo el mundo que tienen 60 años o más, y se espera que para 2050 la población mundial de personas mayores se duplique (Organización Mundial de la Salud, 2020) (**Figura 1**). El aumento de la esperanza de vida es un gran logro a nivel colectivo, que evidencia los avances conseguidos en el ámbito de la salud, el desarrollo social y económico. Sin embargo, hay pocas pruebas que indiquen que una vida más longeva signifique necesariamente poseer una mejor salud y aprovechar plenamente la última etapa de la vida (Organización Mundial de la Salud, 2015). Como resultado, los años de vida adicionales en esta generación están asociados con una peor salud, que se traduce en el aislamiento social y la dependencia de cuidados de estas personas (Organización Mundial de la Salud, 2015). Ante esta situación, la Organización Mundial de la Salud inició el año pasado la nueva estrategia de “La Década del Envejecimiento Saludable (2020-2030)”, entendido como todo un proceso para desarrollar y mantener a edades avanzadas una capacidad funcional suficiente que asegure el bienestar de los más mayores (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Esta estrategia mundial se apoya en la Agenda 2030 de las Naciones Unidas y sus Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), y busca la aplicación de medidas desde diversos sectores (gubernamental, social, académico, sector privado) para introducir el envejecimiento saludable como un objetivo claro en el funcionamiento de la sociedad. Esto implica un abordaje que va más allá de una estrategia social o antropológica, y que requiere de una base científica por la que poder comprender los principios fisiopatológicos del envejecimiento y diseñar así intervenciones, también farmacológicas.

1.2. Enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento

El envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial en el que la homeostasis corporal se ve deteriorada hacia un desequilibrio de los mecanismos compensatorios que aseguraban la funcionalidad motora, inmunológica, metabólica e intelectual del individuo que, por ende, es más vulnerable a las enfermedades y la muerte (Campisi et al., 2019; Kirkwood, 2005). La consecuencia principal desde el punto de vista sanitario es que en una población envejecida hay un cambio radical en las causas más comunes de enfermedad y muerte. En este escenario, las enfermedades crónicas y degenerativas adelantan a las enfermedades infecciosas y agudas (Organización Mundial de la Salud, 2019). Los datos epidemiológicos muestran que las enfermedades más prevalentes entre la población de avanzada edad son las demencias y enfermedades neurodegenerativas, la osteoartritis, el cáncer, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la degeneración macular, las enfermedades cardiometabólicas y las complicaciones y eventos cardiovasculares (Franceschi et al., 2018), por lo que se han denominado enfermedades asociadas a la edad.

Por otro lado, se ha determinado que algunas de las enfermedades más prevalentes entre la población de mayor edad contribuyen y aceleran el envejecimiento por diferentes causas. Además, si se trata de enfermedades con una prevalencia alta no solo en las etapas tardías, sino durante toda la vida de una persona, se presentan como candidatas fundamentales sobre las que dirigir el estudio del envejecimiento. La obesidad y la diabetes son enfermedades crónicas cuya gestión y tratamiento se han convertido en problemas globales de salud (Ng et al., 2014). Múltiples evidencias han demostrado que estas y otras enfermedades crónicas comparten mecanismos comunes con el envejecimiento (Franceschi et al., 2018), y comprenderlos será fundamental para preservar la integridad durante todas las etapas de la vida y así alcanzar un envejecimiento saludable (**Figura 1**).

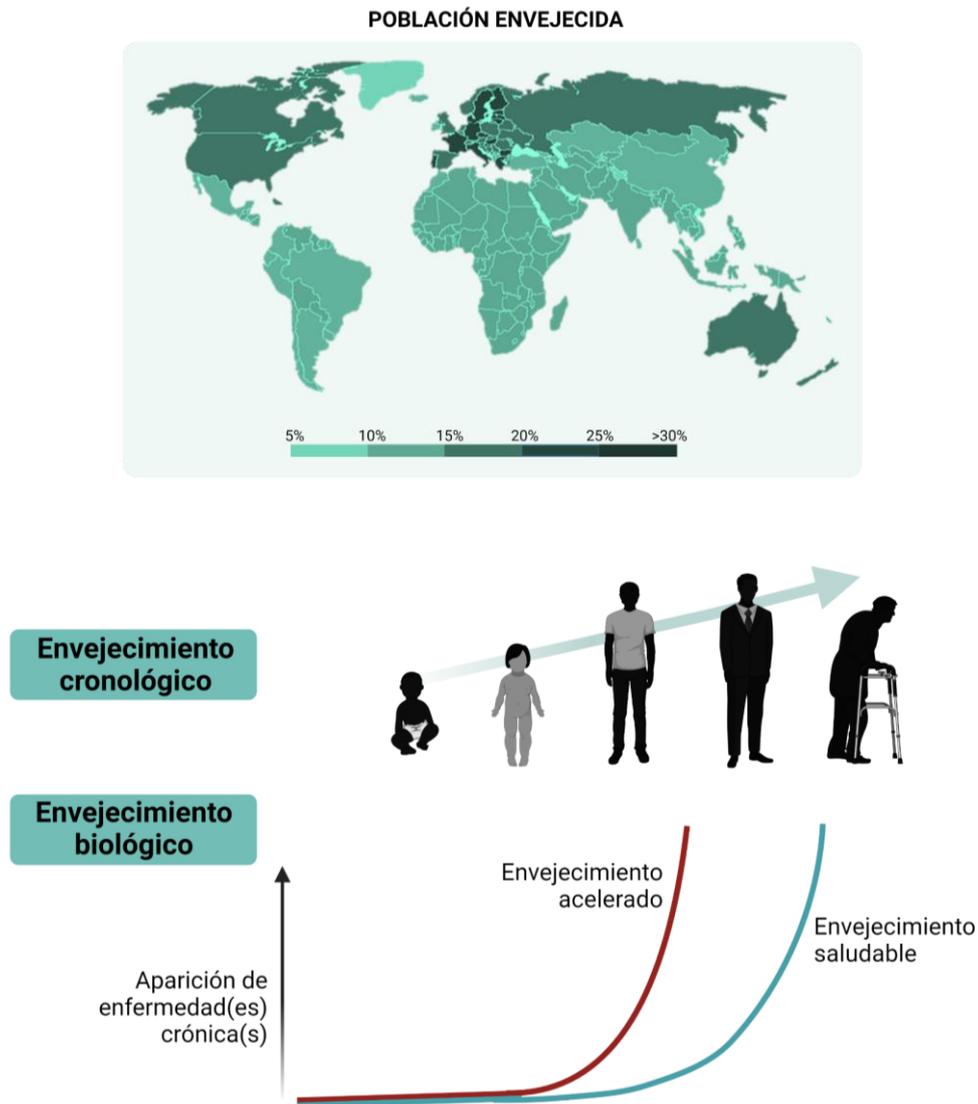


Figura 1. El avance hacia una población envejecida y la apuesta por el envejecimiento saludable. En el mapa se muestran los datos de 2015 de acuerdo al porcentaje de personas mayores de 60 años a nivel global. En los países desarrollados, más del 20% de la población se encuentra en esta franja de edad, que previsiblemente se duplicará en 2050. En la parte inferior se muestra la discordancia entre el envejecimiento cronológico y el envejecimiento biológico dependiendo del momento de aparición de ciertas enfermedades crónicas a lo largo de la vida de una persona. La aparición temprana de enfermedades crónicas acelera el envejecimiento, en cambio, la ralentización en la aparición de estas permitirá alcanzar la edad anciana de forma saludable. Los datos demográficos han sido extraídos de Global AgeWax Index 2015, desde la página web: <https://www.helpage.org/global-agewatch/>. Figura diseñada con Biorender.

2. La diabetes como condición progérica

2.1. Prevalencia e implicaciones socioeconómicas de la diabetes

La obesidad es una enfermedad caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal producida por diversas causas, incluyendo desbalance energético, patologías genéticas, estado de salud mental y efectos derivados de fármacos (World Obesity Federation., 2020). La obesidad es un problema de salud pública de máxima actualidad, con más de 650 millones de personas obesas (índice de masa corporal, $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) en todo el mundo, y casi dos de cada cinco adultos mayores de 18 años con sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) (Organización Mundial de la Salud, 2021b).

El número de personas que fallecen por causa directa o indirecta de la obesidad alcanza los 2,5 millones anuales en los países desarrollados (The European Association for the Study of Obesity, 2021). Además, la obesidad se encuentra muy a menudo ligada a otras comorbilidades asociadas al envejecimiento, que promueven la fragilidad de los pacientes en todas las etapas de la vida. Entre las enfermedades asociadas se identifican enfermedades respiratorias, osteomusculares, oncológicas, psicológicas, cardiovasculares o metabólicas (Qiang et al., 2020; Frasca et al., 2017; Villringer, 2014; de Santos Machado et al., 2013). Respecto a estas últimas, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), que afecta a más de 400 millones de personas en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2021a), destaca sobre las demás. De hecho, la obesidad y la DMT2 aparecen tan frecuentemente relacionadas que se ha empleado el término diabetes para designar la coexistencia de ambas enfermedades (Zimmet, 2017) (**Figura 2**). Además, aparecen asociadas a otros factores de riesgo, especialmente cardiometabólicos, como la hipertensión y la hiperlipidemia en personas que padecen el denominado síndrome metabólico (Day, 2007).

La obesidad y la DMT2 se consideran las únicas enfermedades no infecciosas con una incidencia que ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel global (**Figura 2**). La base de datos sobre el gasto global en salud (GHED, *Global Health Expenditure Database*) y el Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes estimaron un gasto de 760 mil millones de dólares invertidos en la gestión de la diabetes en 2019 (Williams et al., 2020) y hasta 990 mil millones de dólares para la obesidad (Organización Mundial de la Salud, 2019). El informe de carga global de enfermedades (GBD, *Global Burden of Disease report*) indicó que en 2019 la obesidad fue la quinta causa de muerte a nivel global, y que la diabetes y sus

complicaciones asociadas fueron responsables de hasta el 60% de todas las muertes que ocurrieron en los países desarrollados (Ammirati et al., 2020). Esto ha evidenciado y potenciado durante la última década las políticas para la prevención de la obesidad en particular, así como la necesidad de abordar la epidemia actual de la diabetes en general, desde un punto de vista nutricional, psicológico, quirúrgico y farmacológico. La presente tesis doctoral se ha enfocado en abordar este último aspecto, manteniendo la idea de que preservar la salud durante todas las etapas de la vida hará más sencilla la transición hacia un envejecimiento saludable.

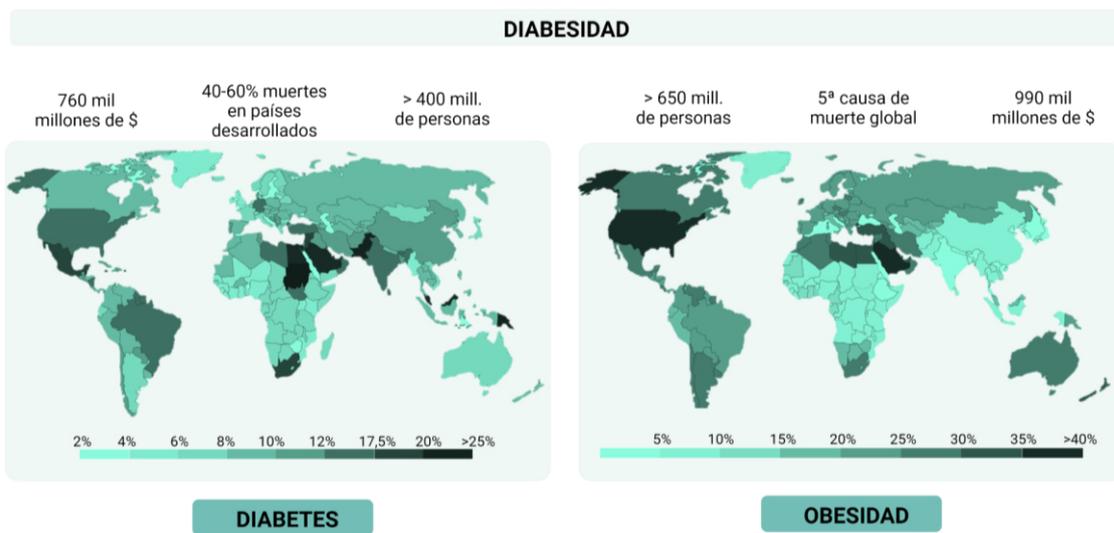


Figura 2. Distribución, epidemiología e impacto socioeconómico de la diabetes. En los mapas se muestra la distribución geográfica de la prevalencia de la diabetes y la obesidad según el porcentaje de personas entre 20-79 años con obesidad o diabetes (sin hacer distinción entre diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2). Datos extraídos del Informe de Estadísticas en materia de Salud 2016 (WHO), el Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes y de la página web ourworldindata.org. Figura diseñada con Biorender.

3. Aspectos comunes entre la diabetes y el envejecimiento

La pérdida de integridad fisiológica durante el envejecimiento subyace también a la diabetes. Esto no quiere decir simplemente que la diabetes sea más prevalente en la población mayor (Fadini et al., 2011), sino que padecer obesidad o diabetes hacen al paciente alcanzar más rápidamente un estado de deterioro propio de una persona anciana. Así, se ha determinado que la diabetes acelera el envejecimiento debido al empeoramiento de la calidad de vida de los pacientes. Esto se ha registrado por un lado en el aumento del número de años de vida ajustados por discapacidad o DALYs (*disability-adjusted life years*) calculado para estas enfermedades (Kotwas et al., 2021; Yu et al., 2021) y, por otro, en la reducción de la esperanza de vida de los pacientes hasta de 6 años en el caso de padecer DMT2 (Sattar et al., 2019) y hasta 4,5 años en el caso de tener obesidad (Bhaskaran et al., 2018).

Los modelos animales, así como los pacientes con obesidad y diabetes, presentan un despliegue de alteraciones que están directamente asociadas con el envejecimiento, como son deterioro cognitivo (Ide et al., 2020; Mclean et al., 2018), mayor riesgo de infección por decadencia del sistema inmune (Yi et al., 2019; Carey et al., 2018; Hernández et al., 2013), un ambiente inflamatorio crónico (Pérez et al., 2016) y un mayor riesgo cardiovascular acompañado de calcificación, fragilidad vascular y rigidez arterial (Burton y Faragher, 2018).

La obesidad y la diabetes afectan a los procesos celulares y moleculares de una manera que se asemeja al envejecimiento (Salvestrini et al., 2019; Pérez et al., 2016). Tomando como referencia los nueve indicadores del envejecimiento consensuados por Lopez-Otín y colaboradores (López-Otín et al., 2013), se ha podido determinar cómo la diabetes afecta a todos y cada uno de ellos: alteración en la sensibilidad a los nutrientes, desgaste telomérico, inestabilidad genómica, senescencia celular, comunicación intercelular alterada, agotamiento del reservorio de células madre, pérdida de la proteostasis, disfunción mitocondrial y acumulación de alteraciones epigenéticas. Por esa razón, la diabetes puede considerarse una condición progerica en el sentido etiológico de la palabra, ya que promueve el envejecimiento. En la **Tabla 1** se muestran las principales evidencias que indican los puntos comunes entre diabetes y envejecimiento, a los cuales se irá haciendo referencia durante la tesis doctoral.

Todo ello pone de manifiesto el interés de la comunidad médica y científica en determinar cuáles son los factores que contribuyen al deterioro y envejecimiento en el contexto de las enfermedades cardiometabólicas como la diabetes. En este trabajo, concretamente, se ha estudiado en qué medida puede frenarse el envejecimiento del sistema cardiovascular, cuyo abordaje se propone como una estrategia clínicamente relevante para retrasar lo máximo posible el desarrollo de enfermedades vasculares en estos pacientes y alcanzar el envejecimiento saludable.

Tabla 1. Resumen de las evidencias en la literatura sobre la influencia de la diabetes y/o la obesidad en los consensuados nueve indicadores del envejecimiento. Uno de los criterios tomados por Lopez-Otín y colaboradores (López-Otín et al., 2013) para definir estos indicadores fue determinar que el agravamiento de cualquiera de ellos debía acelerar el envejecimiento. La literatura ha evidenciado que la obesidad y la diabetes afectan, alteran o agravan situaciones relacionadas con los nueve indicadores, y por lo tanto pueden ratificarse como condiciones progéricas que aceleran el envejecimiento de quien las padece.

Indicadores de Envejecimiento "The 9 hallmarks of aging"	Diabetes
Alteración en la sensibilidad a nutrientes	Resistencia a la insulina e insensibilidad a la glucosa en los tejidos insulino-dependientes (Salvestrini et al., 2019)
Desgaste telomérico	Asociación inversa entre la longitud de los telómeros, el IMC, la adiposidad, la resistencia a la insulina y la alteración en la tolerancia a la glucosa (Gielen et al., 2018; Adaikalakoteswari et al., 2006; Obana et al., 2003)
Inestabilidad genómica	Acumulación de daños en el ADN debido al estrés oxidativo y la inflamación crónica de bajo grado subyacente a la diabetes (Jurk et al., 2014) Menor capacidad para reparar los daños en el ADN en personas obesas (Ungvari et al., 2018)
Senescencia celular	Acumulación de células senescentes en el tejido adiposo y la pared vascular de pacientes obesos y diabéticos (Villaret et al., 2010; Voghel et al., 2007) Asociación entre una mayor incidencia de las complicaciones vasculares y el desarrollo de senescencia endotelial (Dungan et al., 2020; Frasca et al., 2017)
Alteración de la comunicación intercelular	Alteración en el perfil de mediadores que contribuyen a la inflamación crónica de bajo grado a nivel local y sistémico (Krintus et al., 2014; Danesh et al., 2004) Efectos paracrinos del secretoma senescente (van Deursen, 2014) Redistribución de depósitos de tejido adiposo que altera y desregula su perfil secretor y sus efectos paracrinos y endocrinos (Reyes-Farias et al., 2021)
Agotamiento del reservorio de células madre	Reducción de la población circulante de células endoteliales progenitoras que reparan las zonas vasculares dañadas mediante mecanismos compensatorios de angiogénesis (Werner y Nickenig, 2006)

Introducción

Pérdida de la proteostasis	Acumulación de agregados de proteínas mal plegadas en los tejidos de personas obesas y diabéticas (Ungvari et al., 2018)
Disfunción mitocondrial	Desacoplamiento de la cadena de electrones y estrés oxidativo como consecuencia de las alteraciones metabólicas en la diabetes (Liesa y Shirihai, 2013) Reducción de la biogénesis mitocondrial en la obesidad (Heinonen et al., 2015)
Alteraciones epigenéticas	Menor actividad desacetilasa por las enzimas sirtuinas (SIRT), que aumenta el estado inflamatorio del tejido adiposo (Gillum et al., 2011) Cambio en el patrón de metilación del ADN en la obesidad (Niculescu y Lupu, 2011)

4. Diabetes, aterosclerosis y riesgo cardiovascular

La obesidad y la DMT2 son factores independientes de riesgo cardiovascular (Kalra, 2013) y, cuando ambas patologías coexisten, el resultado es que la diabetes constituye un riesgo cardiovascular superior al asociado a cada una de las enfermedades por separado (Chadt et al., 2018). Por un lado, la vasculopatía diabética es la mayor causa de morbilidad en la diabetes. Incluye complicaciones microvasculares que afectan a los vasos sanguíneos de pequeño calibre y a los capilares, como en el caso de la retinopatía diabética o la enfermedad renal crónica; así como la aterosclerosis que induce complicaciones macrovasculares en las grandes arterias (Cooper et al., 2001). Los eventos cardiovasculares como la enfermedad coronaria, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad arterial periférica, son causa del 80% de las muertes en los pacientes con DMT2 (Strain y Paldánus, 2018). Por su parte, el depósito excesivo del tejido adiposo influye en cambios hemodinámicos que afectan a la función cardíaca, como son un mayor volumen de sangre y rendimiento cardíaco, y la reducción de la resistencia sistémica vascular (Poirier et al., 2006). Así, dos tercios de las muertes asociadas con la obesidad están causadas por enfermedades cardiovasculares como infarto agudo de miocardio, arritmias, fibrilación aórtica, ictus o tromboembolismo venoso (Powell-Wiley et al., 2021). La obesidad también se asocia con alteraciones microvasculares que implican el remodelado vascular de los pequeños vasos (Schindler et al., 2006).

Las complicaciones vasculares que más muertes causan en la diabetes subyacen a una alteración patológica mayor: la aterosclerosis. Esta enfermedad está definida como el proceso de estrechamiento del calibre arterial por la formación de placas lipídicas o de ateroma debido al efecto secuencial de inflamación, fibrosis, calcificación y necrosis de la pared

vascular (**Figura 3**) (Bentzon et al., 2014; Wang, C. et al., 2016). La aterosclerosis se inicia debido al depósito en la capa íntima arterial de ésteres de colesterol contenidos en lipoproteínas de baja densidad (LDL). La agregación y modificación de las LDL provoca la inflamación de las capas endotelial y de músculo liso vascular, que liberan toda una batería de mediadores tróficos para las células del sistema inmune. Los monocitos reclutados a la pared vascular, más tarde diferenciados a macrófagos, fagocitan y almacenan el colesterol y otros lípidos, transformándose en células espumosas que amplifican aún más la respuesta inflamatoria. A su vez, las células de músculo liso proliferan, migran hacia la íntima donde favorecen el engrosamiento de la pared arterial, y contribuyen a su lesión favoreciendo la calcificación y rigidez de la placa (Low Wang et al., 2016). La obesidad, la DMT2 y otros factores de riesgo aceleran estos primeros cambios en el proceso de aterosclerosis, así como situaciones avanzadas de estenosis, rotura y embolismo de la placa de ateroma debido a mecanismos que incluyen la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación crónica (Kalyani et al., 2017; McGill et al., 2002).

4.1. Disfunción endotelial

A pesar de que la manifestación clínica de la aterosclerosis debuta en estados avanzados de la enfermedad, las alteraciones funcionales y estructurales de las arterias pueden ser detectadas muy temprano. Se han observado evidencias de aterosclerosis incluso en niños con obesidad que manifiestan signos de reactividad vascular deteriorada, aumento del grosor íntima-media y reducción de la distensibilidad arterial (Meyer et al., 2006). La disfunción endotelial es fundamental para el progreso del estrechamiento y endurecimiento de las arterias y, de hecho, se presenta como uno de los indicadores tempranos de la aterosclerosis (Avogaro et al., 2011).

El endotelio consiste en una única capa de células que rodea el lumen de los vasos sanguíneos y está en contacto directo con la sangre. Las células endoteliales juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y el correcto funcionamiento de la vasculatura. Además de formar una barrera mecánica entre la sangre y las otras células de la pared vascular, libera mediadores autocrinos y paracrinos en un perfecto equilibrio que controlan la relajación-contracción y el mantenimiento del tono vascular, la coagulación-

Introducción

fibrinólisis y la adhesión plaquetaria; así como la inflamación y el reclutamiento de células del sistema inmune (Deanfield et al., 2007).

Cuando se altera la producción de mediadores homeostáticos comienza un estado patológico de disfunción endotelial. El óxido nítrico (NO) es el mayor responsable en el mantenimiento basal de la homeostasis endotelial. Su papel vasculoprotector se basa en sus acciones como potente vasorelajador sobre la capa de músculo liso vascular, como inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria y como regulador de la activación endotelial en general (Viridis et al., 2010). Por tanto, la reducción en la biodisponibilidad de NO marca el inicio de la disfunción endotelial (Incalza et al., 2017). Por un lado, la síntesis de NO por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) aparece disminuida en las células endoteliales activadas. Por otro lado, el estrés oxidativo, y concretamente los aniones superóxido (O_2^-), pueden reaccionar con el NO y degradarlo para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), que promueve la nitración de proteínas y contribuye a la disfunción y muerte de las células endoteliales (Pacher et al., 2005). Además, cuando el endotelio se activa, aumenta la producción de mediadores vasoconstrictores como endotelina 1 (ET-1) y tromboxano A₂ (TXA₂); prooxidantes como especies reactivas de oxígeno (ROS); procoagulantes como el factor de coagulación von Willebrand (factor VIII) o el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (IAP-1), y proinflamatorias como las moléculas de adhesión vascular e intercelular (VCAM-1, ICAM-1) y el factor quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (**Figura 3**) (Avogaro et al., 2011). La disfunción endotelial supone la activación del endotelio y la pérdida del tono vascular, y favorece el desarrollo de trombosis, la proliferación de las células vasculares, la inflamación y la ruptura de las placas de ateroma. Por todo ello, se ha determinado una asociación clara entre la disfunción endotelial y el desarrollo de eventos cardiovasculares, haciendo al endotelio una diana para las estrategias de prevención y detección de la enfermedad cardiovascular temprana.

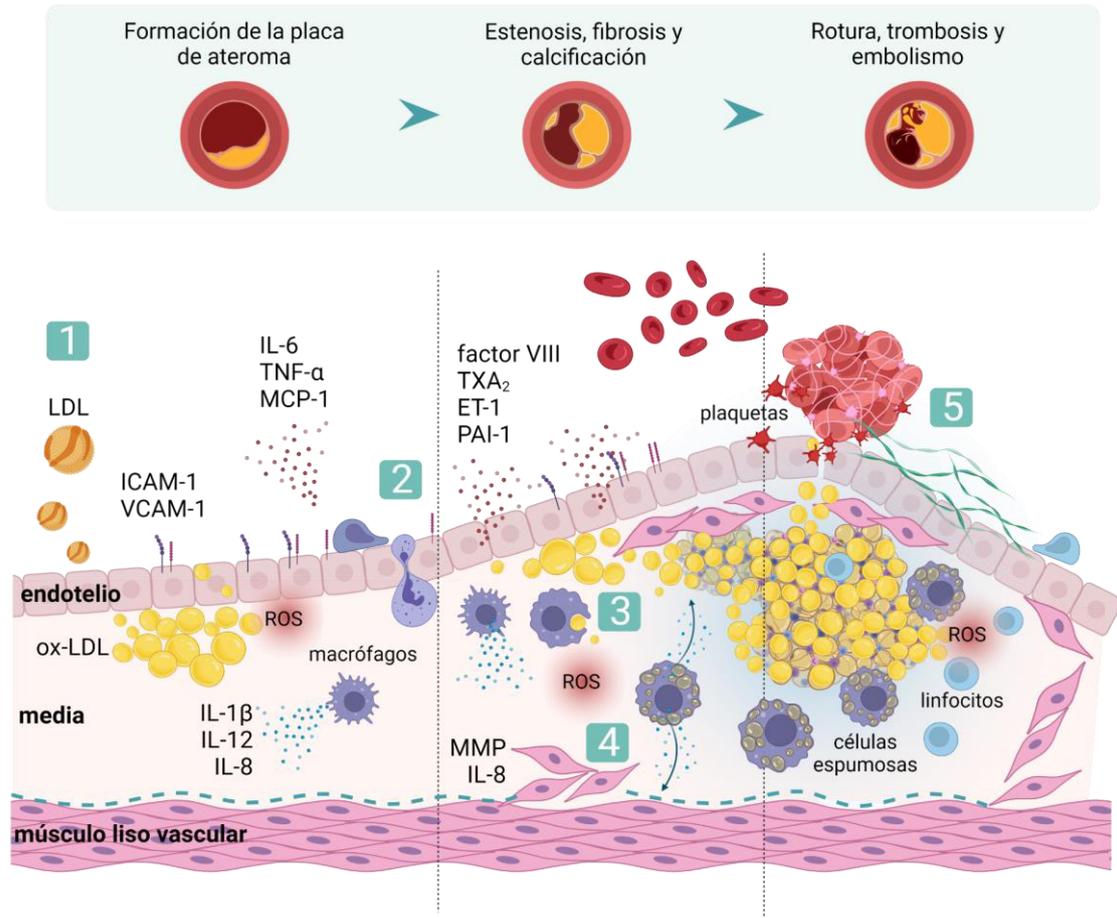


Figura 3. Progresión de la aterosclerosis y alteraciones de la pared vascular. La aterosclerosis avanza con el progresivo estrechamiento del calibre arterial. **(1)** Se inicia con la formación de la placa de ateroma debido a la acumulación y oxidación de LDL en la capa media vascular. **(2)** El endotelio activado expresa proteínas de adhesión y libera mediadores tróficos para las células del sistema inmune, que se extravasan a la capa media. **(3)** Los macrófagos fagocitan el colesterol y otros lípidos, se diferencian a células espumosas y amplifican la señal inflamatoria. **(4)** En una etapa más avanzada, las células de músculo liso alteran la matriz extracelular y la lámina media, proliferan y migran hacia la capa media, donde contribuyen a la inflamación y calcificación de la placa de ateroma. **(5)** La placa llega a romperse, formándose un coágulo de plaquetas y material fibroso que bloquea el torrente sanguíneo, causando isquemia local o en otra zona del árbol vascular en caso de ser arrastrado y embolizado. Figura diseñada con Biorender.

5. Enfermedades cardiovasculares y envejecimiento vascular prematuro

5.1. Aspectos estructurales y funcionales del envejecimiento vascular

El envejecimiento está asociado con cambios estructurales, moleculares y funcionales en la pared vascular, incluso de forma independiente a la existencia de otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la aterosclerosis o la diabetes (Costantino et al., 2016; Kotsis et al., 2011). Se ha considerado que el envejecimiento vascular es un proceso inevitable que afecta a la salud de la población mayor. Sin embargo, cada vez está más aceptada la importancia de desarrollar estrategias que mejoren y protejan la función vascular en todas las etapas de la vida y, especialmente, en aquellas personas que padecen enfermedades que aceleran el envejecimiento vascular. La identificación de los mecanismos y los mediadores que influyen en el envejecimiento vascular prematuro podrá mejorar la función cardiovascular en la población afectada.

El médico inglés del siglo XVII Thomas Sydenham ya establecía que “un hombre es tan viejo como lo son sus arterias”. Así, el envejecimiento vascular acelerado supone la aparición gradual de alteraciones en la vasculatura de una forma similar a la que ocurre durante las etapas tardías de la vida, pero en personas no necesariamente ancianas (Nilsson, 2008). Esta disociación entre el envejecimiento cronológico y el envejecimiento biológico a nivel vascular se atribuye a factores genéticos, a la acumulación de factores de riesgo o a la exposición de los vasos sanguíneos a estímulos dañinos de cualquier índole (Cunha et al., 2017). Se han establecido tres mecanismos mayoritarios que influyen en el avance del envejecimiento vascular acelerado: i) el estrés causado por variaciones en el ciclo cardíaco, ii) el deterioro de los mecanismos de reparación en la pared arterial en respuesta a los daños y iii) el desequilibrio en los mediadores que afectan a la pared arterial y están asociados a enfermedades como la hipertensión, la dislipidemia, la diabetes o la obesidad, entre otras.

Las principales manifestaciones del envejecimiento vascular acelerado incluyen el aumento de la rigidez arterial, la dilatación de las arterias centrales elásticas, el empeoramiento de la función endotelial y un estado de vasodilatación generalizado. Precisamente es en la base de estos cambios estructurales y funcionales donde se encuentran los mecanismos promotores de envejecimiento que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, la alteración en la comunicación intracelular debida a la modificación de la matriz

extracelular en la capa media arterial tiene como consecuencia directa el remodelado vascular, la reducción de la distensibilidad arterial y de la capacidad de los vasos sanguíneos para adaptarse a los cambios en la presión arterial (Kotsis et al., 2011). Por su parte, el desgaste telomérico, la inestabilidad genómica y la acumulación de células endoteliales senescentes contribuyen al deterioro de la vasodilatación dependiente de endotelio, indicador temprano de un envejecimiento vascular prematuro (Nilsson, 2008). Es en estos dos últimos aspectos, la senescencia y la disfunción endotelial, en los que se ha centrado la presente tesis doctoral.

5.2. Senescencia endotelial y función vascular

5.2.1. Senescencia replicativa y senescencia inducida por estrés

La senescencia celular es un mecanismo fisiopatológico en el que las células se mantienen en un estado permanente de parada del ciclo celular. La senescencia está asociada a una serie de perturbaciones morfológicas y estructurales que producen la pérdida de la homeostasis celular (Erusalimsky, 2009). Las células senescentes no mueren y son metabólicamente activas, pero adquieren una serie de características que comprometen sus funciones normales y su papel dentro del tejido (Campisi y d'Adda Fagagna, 2007). Por esta razón, la senescencia que afecta a las células endoteliales es uno de los principales determinantes del envejecimiento vascular.

La senescencia celular cumple un papel protector desde el punto de vista fisiológico, ya que, en respuesta a cambios potencialmente dañinos, evita que las mutaciones puedan transmitirse a las consiguientes generaciones celulares. La senescencia es fundamental en el proceso de desarrollo embrionario o en la formación de tejido cicatricial, y además evita la progresión de tumores (Kuilman et al., 2010; Herranz y Gil, 2018). Sin embargo, en situaciones patológicas, fuentes de estrés puntuales pueden desencadenar una respuesta senescente aguda que afecta al tejido pasajeramente hasta que se recupera la homeostasis tisular. Por ejemplo, se ha observado que las células senescentes por activación de oncogenes pueden ser rápidamente reconocidas y eliminadas por el sistema inmune (Kang et al., 2011). Por otro lado, el proceso de senescencia puede desarrollarse en respuesta a diversas fuentes de estrés intracelular o extracelular, incluyendo estrés oxidativo o genómico, disfunción mitocondrial, irradiación o agentes quimioterapéuticos (Herranz y Gil, 2018). La respuesta senescente

Introducción

puede ser crónica cuando las señales pro-senescentes son continuadas, como en el caso del envejecimiento o en la diabetes.

Desde que Hayflick y Moorhead definieron el término senescencia en 1961 y después se estableciera el "límite Hayflick" como el número finito de veces que las células pueden dividirse en un cultivo (Hayflick, 1965), se ha determinado este límite máximo de replicación para diferentes tipos celulares *in vitro*. Este tipo de senescencia por agotamiento de la capacidad proliferativa se denomina senescencia replicativa y es consecuencia directa de la sucesión de divisiones. También se ha demostrado que este fenómeno ocurre *in vivo*. Las personas de avanzada edad acumulan células senescentes en sus tejidos y órganos (Erusalimsky y Kurz, 2005), pero además se han observado células senescentes en los tejidos de personas jóvenes que padecen aterosclerosis (Minamino et al., 2002), obesidad (Dungan et al., 2020; Frasca et al., 2017; Villaret et al., 2010) o DMT2 (Voghel et al., 2007). De hecho, las áreas que aparecen más frecuentemente cubiertas por células senescentes son aquellas con una mayor tasa de recambio, como es la capa de células endoteliales y, más concretamente, las situadas en aquellas áreas vasculares más propensas al desarrollo de placas de ateroma como las bifurcaciones y ramificaciones arteriales (Brodsky et al., 2004).

5.2.2. Mecanismos y fenotipo de la respuesta senescente

Desde un punto de vista molecular, la senescencia replicativa se debe al acortamiento progresivo y la disfunción de los telómeros, que actúan como extremos protectores del ADN (Kuilman et al., 2010; Erusalimsky y Kurz, 2005). Sin embargo, la senescencia inducida por estrés está desencadenada por eventos independientes que inducen daño en el ADN en zonas teloméricas y no teloméricas, o incluso que inducen daño celular de otro tipo (Toussaint et al., 2000).

El daño de la doble cadena de ADN es el estímulo mayoritario que activa las señales de alarma que desencadenan la respuesta senescente. La histona H2AX constituye una proporción significativa de las histonas de la familia H2A en los nucleosomas de organización de la cromatina (Fragkos et al., 2009). La histona H2AX se diferencia de otras de la misma familia porque posee un motivo carboxilo terminal cuyo residuo serina 139 se fosforila rápidamente (γ H2AX) cuando se introducen daños de doble cadena en el ADN y comienza la respuesta de reparación de este daño (DDR, *DNA damage response*) (Rogakou et al., 2000). Así, γ H2AX se ha validado como un marcador de senescencia en la literatura (**Figura 4**)

(Donato et al., 2015; Villalobos et al., 2014). En el contexto de las enfermedades cardiovasculares, se ha observado que las células endoteliales poseen unos mecanismos de reparación del ADN menos eficientes que otros tipos celulares, y las alteraciones en la expresión génica las hacen más resistentes a la apoptosis (Ungvari et al., 2018). Las células endoteliales que mueren se desprenden de la pared vascular y se ha determinado que los niveles circulantes de células o componentes endoteliales encapsulados están aumentados en pacientes con DMT2 (McClung et al., 2005). Como consecuencia, la acumulación de células endoteliales senescentes intensifica el estado proinflamatorio de la vasculatura y contribuye al daño del tejido, que además pierde su capacidad regenerativa (Erusalimsky y Kurz, 2005).

Mitógenos, citoquinas proinflamatorias y agentes prooxidantes son algunos de los mediadores que pueden desencadenar la respuesta senescente. Estas señales tienen como efectores finales las vías moleculares de parada del ciclo celular, que involucran a las redes de los efectores supresores de tumores p53/p21 o retinoblastoma/p16^{INK4A} (en adelante p16) (Donato et al., 2015). En ambos casos, la activación de p21 y p16 inhibe la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK)-2, CDK-4 o CDK-6, teniendo como resultado el bloqueo de los puntos de control y la parada permanente del ciclo celular (**Figura 4**) (Yoshida y Miki, 2010).

Las células endoteliales senescentes en cultivo muestran cambios morfológicos característicos como un aumento de tamaño, la presencia de núcleos polimórficos, un aspecto alargado y aplanado y una intensa vacuolización (Herranz y Gil, 2018). También se caracterizan por cambios en su expresión génica que les hacen adquirir un fenotipo secretor con características proinflamatorias, prooxidativas y protrombóticas (**Figura 4**) (Coppé et al., 2010). El fenotipo secretor asociado a senescencia (*senescence-associated secretory phenotype*, SASP) implica una mayor producción de factores de crecimiento, proteasas de la matriz extracelular, y citoquinas como la interleuquina (IL)-6, IL-8, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α o MCP-1, entre otros mediadores (Herranz y Gil, 2018; Erusalimsky y Kurz, 2005). El efecto paracrino del SASP permite a las células senescentes propagar su fenotipo y empeorar la función del tejido (Acosta et al., 2013; Tasdemir y Lowe, 2013). Además, las células endoteliales senescentes presentan altos niveles de ROS y menor biodisponibilidad de NO debido también a alteraciones en la actividad de la NOS endotelial (eNOS) (Wu et al., 2020). Tanto es así que se ha observado una relación directa entre la senescencia y la disfunción endotelial (Carracedo et al., 2018). De hecho, los modelos animales de

Introducción

envejecimiento acelerado (Novella et al., 2013), como la población mayor (El Assar et al., 2012; Rodriguez-Manas et al., 2009) presentan una función endotelial comprometida.

Otra característica común del fenotipo senescente es el aumento de la actividad enzimática β -galactosidasa y la tinción positiva para la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (*senescence-associated- β -galactosidase*, SA- β -gal) (**Figura 4**), que se considera una manifestación del aumento del componente lisosomal en las células senescentes (Kurz et al., 2000). A pesar de que no se conoce exactamente qué origina esta actividad, una posibilidad es que se debe a la acumulación de vacuolas autofágicas con restos de células dañadas, orgánulos y macromoléculas que no pueden degradarse (Itahana et al., 2007; Dimri et al., 1995). También hay evidencias de la liberación del contenido vacuolar pudiera contribuir al SASP (Erusalimsky, 2009). En cualquier caso, la tinción para SA- β -gal se considera un método fiable y de primera línea para detectar células senescentes en cultivo de forma específica, diferenciándolas de las células quiescentes (Dimri et al., 1995). Sin embargo, no existen técnicas no invasivas que permitan evaluar la senescencia endotelial *in vivo*. Por esa razón, cada vez es más importante determinar marcadores e inductores de senescencia endotelial como nuevas dianas farmacológicas.

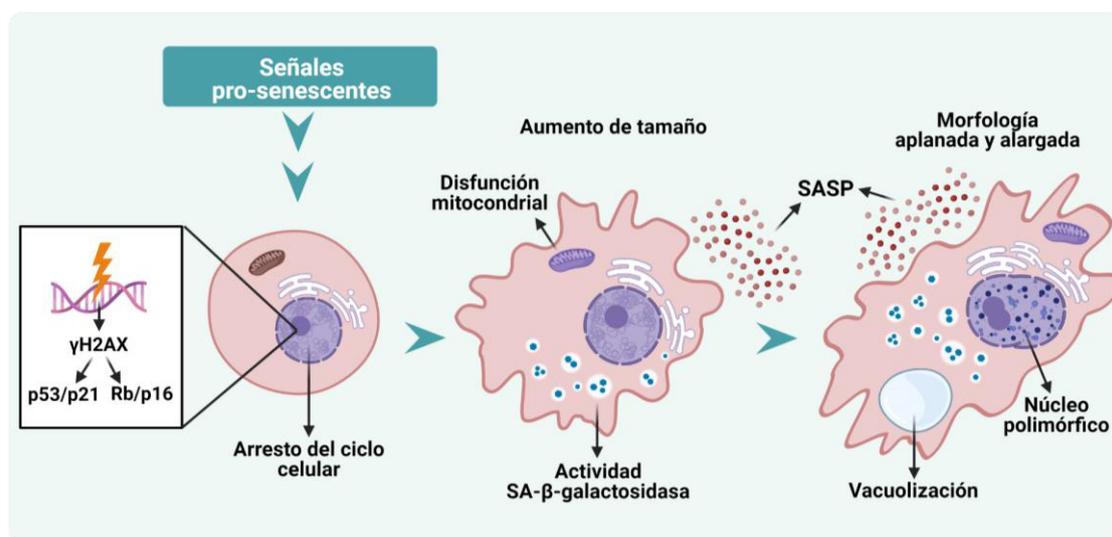


Figura 4. Características del fenotipo senescente. En respuesta a señales pro-senescentes, el daño en el ADN y la activación de la maquinaria que induce el arresto del ciclo celular desencadenan la respuesta senescente. Le siguen cambios morfológicos y de expresión génica, que contribuyen a la liberación del intenso SASP con propiedades proinflamatorias, protrombóticas y prooxidantes donde también contribuyen las ROS a consecuencia de la disfunción mitocondrial. El compartimento lisosomal crece y aumenta la actividad SA- β -gal y la aparición de vacuolas en el citoplasma celular. Figura diseñada con Biorender.

6. Envejecimiento vascular e inflamación: *inflammaging*

6.1. Inflamación crónica de bajo grado

Las enfermedades asociadas al envejecimiento comparten un estado crónico de inflamación de bajo grado que se ha denominado en inglés "*inflammaging*" (Franceschi et al., 2000). El *inflammaging* o envejecimiento inflamatorio contribuye a la acumulación excesiva del tejido adiposo, la descompensación del metabolismo, la resistencia a la insulina y la fragilidad vascular en la población mayor (Franceschi et al., 2018); que además son aspectos determinantes en las comorbilidades asociadas a la diabetes. De hecho, las evidencias más recientes han identificado una conexión directa entre el envejecimiento inflamatorio, la disfunción metabólica y la expansión de la respuesta senescente en los tejidos y órganos de estos pacientes, con especial hincapié en la pared vascular (Lee et al., 2021). Por tanto, al igual que la senescencia endotelial, este envejecimiento inflamatorio se presenta como otro de los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen al avance del envejecimiento vascular acelerado.

La diabetes cursa con elevados niveles plasmáticos de mediadores proinflamatorios, como proteínas inflamatorias de fase aguda que incluyen la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) o el fibrinógeno, y citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α o IL-1 β . De hecho, estos mediadores se consideran marcadores subrogados (Krintus et al., 2014; Danesh et al., 2004) y predictores de riesgo cardiovascular en hombres y mujeres (Ridker, 2016). Por otro lado, se ha observado que los fármacos que se han empleado comúnmente para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, como las estatinas, precisamente previenen los eventos cardiovasculares a través de sus efectos antiinflamatorios (Antonopoulos et al., 2012). Además, estudios recientes han demostrado que las intervenciones farmacológicas que bloquean directamente a los mediadores proinflamatorios son beneficiosas para el tratamiento de la aterosclerosis y la resistencia a la insulina (Ridker et al., 2017; Burska et al., 2015). Incluso en el caso de la diabetes, el control estricto de los niveles de glucosa en sangre no es suficiente para paliar las comorbilidades asociadas, y se propone cada vez más el abordaje de la inflamación como un enfoque terapéutico (Prattichizzo et al., 2018).

Introducción

La acumulación de células senescentes, a través del SASP, contribuye al estado de inflamación crónica de bajo grado (van Deursen, 2014). Desde un punto de vista molecular, los factores liberados en el SASP están regulados en gran medida por el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor- κ B*, NF- κ B), el factor de transcripción inflamatorio por excelencia (Chien, Y. et al., 2011). En esta línea, la inmunosenescencia, entendida como el deterioro del propio sistema inmune, también agrava e intensifica la respuesta inflamatoria (Franceschi et al., 2000), no tanto porque las células inmunes adquieran las características de una célula senescente, sino porque en el contexto de las enfermedades crónicas, se ha observado un funcionamiento inadecuado en las respuestas de defensa. La inmunosenescencia se ve representada con una menor capacidad fagocítica de los leucocitos y un perfil hiperinflamatorio generalizado, que suponen alteraciones en la coordinación tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa (Youm et al., 2012), como se desarrolla a continuación.

6.2. El inflamasoma NLRP3

6.2.1. NLRP3: inmunidad innata y enfermedad crónica

El sistema inmune innato es la primera, más conservada evolutivamente y rápida línea de protección que posee el organismo para defenderse frente a la infección por patógenos, el daño y el estrés celular (Li y Wu, 2021). La respuesta inmune innata se inicia con el reconocimiento de patrones conservados en los patógenos o PAMPs (*patogen-associated molecular patterns*) o en las células endógenas que han sufrido un daño (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*). Los receptores del reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*) se dividen en diversas familias, entre las que destacan los receptores de tipo "toll" (TLR), los receptores de lectina tipo C (CLRs) o los receptores similares al dominio de oligomerización y unión a nucleótidos (NLR) (Li y Wu, 2021). Estos últimos conforman la familia más extensa y diversa de todos los PRR. Todos ellos comparten una estructura similar con un dominio efector amino terminal de tipo pirina (PYD), un dominio central de unión a nucleótidos (NOD/NATCH) y un extremo carboxilo terminal rico en repeticiones de leucina (LRR) (Swanson et al., 2019). La respuesta desencadenada por la activación de los NLR induce una potente señal proinflamatoria que regula procesos biológicos como la respuesta transcripcional que controla la vía NF- κ B y de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK),

la autofagia, la presentación de antígenos, la muerte celular y la formación de un complejo o inflamasoma que amplifica aún más la señal inflamatoria mediante el procesamiento y liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-18 (Wang, L. y Hauenstein, 2020).

Los inflamasomas son complejos multiproteicos citoplasmáticos formados por la unión de un receptor de tipo NLR, una proteína adaptadora estructural y una proteína efectora. El inflamasoma que porta el receptor NLR que contienen el dominio pirina 3 (NLRP3) es el más ampliamente estudiado desde su descubrimiento en 2002 (Martinon y Tschopp, 2002). La activación canónica del inflamasoma NLRP3 es un proceso secuencial en dos etapas: una primera fase de cebado y una segunda fase de activación (**Figura 5**). Un primer estímulo desencadena la fase de cebado, que implica la activación de NF- κ B y el aumento en la expresión de NLRP3, de la proteína estructural formadora de "*specks*" asociada a apoptosis con dominio CARD (ASC) y de la forma inmadura de IL-1 β e IL-18 (pro-IL-1 β , pro-IL-18), que servirán como sustratos para la caspasa-1, que actúa como proteína efectora. En la primera fase también ocurren toda una serie de modificaciones postraduccionales en NLRP3 que favorecen su cambio conformacional y oligomerización, haciendo posible la unión a ASC para formar el complejo inflamasoma. Una segunda señal desencadena la fase de activación. Esta supone el autoprocésamiento de la caspasa-1 dentro del complejo para mediar la escisión de pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus formas maduras, y la liberación de estas al medio extracelular. Además, la activación del inflamasoma NLRP3 da lugar a la muerte celular programada por piroptosis, mediante la formación de poros de gasdermina D (GSDMD) en la membrana celular, que facilitan la liberación de IL-1 β e IL-18 (Swanson et al., 2019).

El inicio de la cascada molecular que activa el inflamasoma NLRP3 generalmente depende de la estimulación de receptores en la superficie celular como los TLR o el receptor purinérgico P2X7 (Wang, L. y Hauenstein, 2020). También es sensible a las corrientes de iones de potasio (K⁺), cloro (Cl⁻) o calcio (Ca²⁺), la modificación del compartimento lisosomal y el estrés mitocondrial. Entre las moléculas activadoras se han identificado el lipopolisacárido bacteriano (LPS), algunas toxinas microbianas que forman poros en la membrana, citoquinas como TNF- α o IL-1 β , nigericina y adenosin trifosfato extracelular (ATP) (**Figura 5**) (Wang, L. y Hauenstein, 2020). Sin embargo, la activación de NLRP3 puede ocurrir también en ausencia de una infección. En condiciones fisiopatológicas determinadas esto tiene como resultado la activación descontrolada del inflamasoma NLRP3, por lo que se ha implicado como elemento de unión entre el sistema inmune y algunas enfermedades crónicas. Se ha identificado que

Introducción

NLRP3 puede actuar también como un sensor de daño o pérdida de homeostasis sistémica. El complejo sería capaz de integrar diversas señales y funcionar como un amplificador. Por ejemplo, también son activadores del inflamasoma NLRP3 los cristales de colesterol, los ácidos grasos libres no esterificados (NEFA), las moléculas de LDL oxidado y el polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos (IAPP), los cuales aparecen descompensados en el contexto de la aterosclerosis, la resistencia a la insulina y la diabetes (Gritsenko et al., 2020; Haneklaus y O'Neill, 2015). De hecho, se ha determinado que la activación descontrolada del inflamasoma NLRP3 contribuye directamente a la respuesta inflamatoria de bajo grado subyacente a las enfermedades metabólicas y al envejecimiento (**Figura 5**) (De Nardo, 2011).

6.2.2. El inflamasoma NLRP3 y el envejecimiento vascular

Como se ha mencionado anteriormente, el deterioro del sistema inmune y la sobre-activación del inflamasoma NLRP3 se consideran motores que impulsan el *inflammaging* y la disfunción metabólica en las enfermedades cardiovasculares. El inflamasoma NLRP3 es un punto central que conecta la inflamación crónica y metabólica con la senescencia celular y la disfunción tisular (Lee et al., 2021). Los animales deficientes en NLRP3 o IL-1 β han demostrado ser resistentes a la obesidad inducida por dieta alta en grasa (Rheinheimer et al., 2017; Vandanmagsar et al., 2011), con un mejor perfil metabólico, tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Además, son más longevos y presentan menores signos de envejecimiento en comparación con ratones salvajes (Youm et al., 2012).

Se ha propuesto que algunos de los cambios biológicos asociados al *inflammaging* podrían potenciar la respuesta desencadenada por el inflamasoma NLRP3. La inestabilidad genómica, el acortamiento telomérico, el estrés oxidativo y el propio SASP liberado por las células senescentes inducen la activación del inflamasoma NLRP3 y, a su vez, están controlados por su actividad en un ciclo de retroalimentación positiva (Romero et al., 2021; Acosta et al., 2013). Se ha demostrado que el bloqueo del inflamasoma NLRP3 previene la senescencia en cardiomiocitos (Huang et al., 2020), así como la disfunción endotelial en ratones obesos (Zhang et al., 2017). Por tanto, se ha propuesto que el inflamasoma NLRP3 puede ser una diana para el abordaje de la senescencia endotelial (Yin et al., 2017), aunque la evidencia de su implicación en el avance del envejecimiento vascular acelerado es todavía escasa.

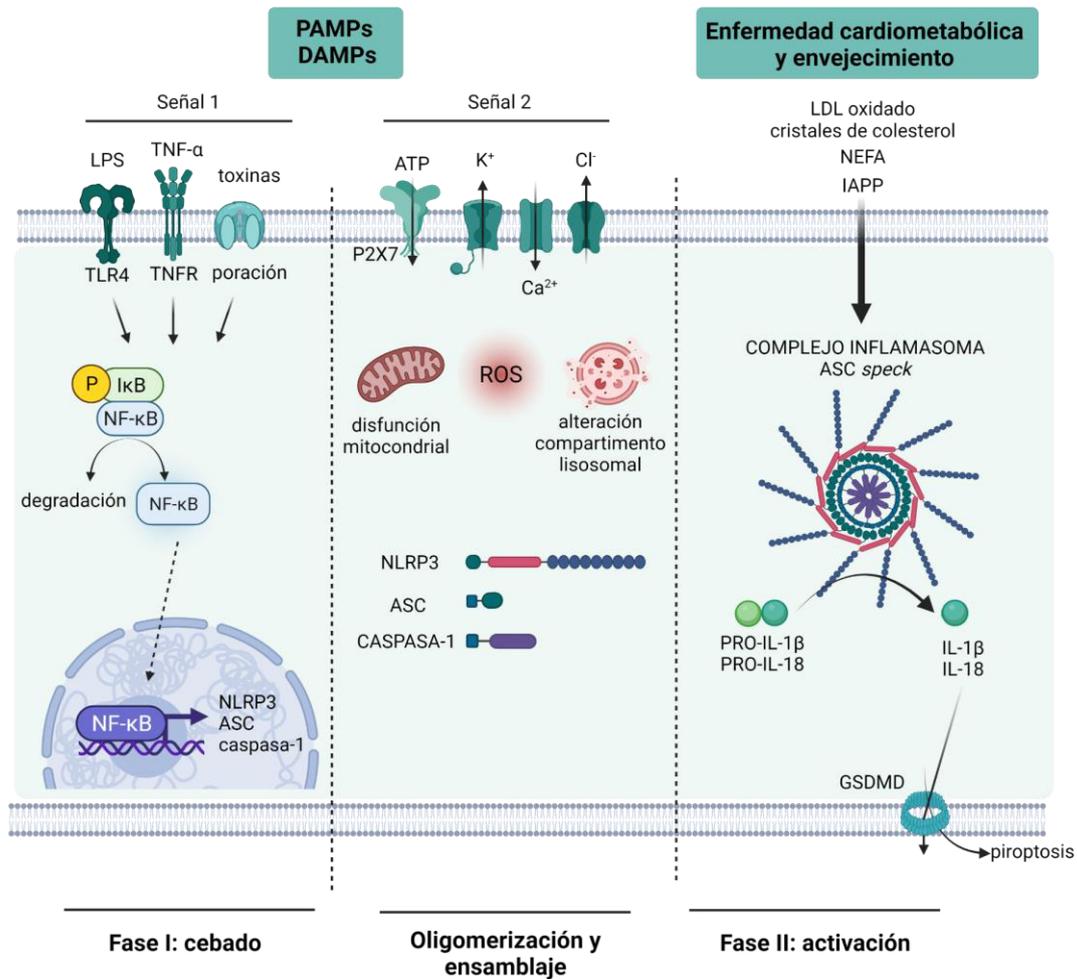


Figura 5. El complejo inflamasoma NLRP3 integra señales y actúa como punto de unión entre el sistema inmune y el metabolismo. El inflamasoma NLRP3 es un componente esencial en la respuesta inmune innata. Su activación está regulada en un proceso bifásico. En la fase de cebado, una señal dañina (PAMP o DAMP) a través de PRR (TLR4, TNFR) induce la activación de NF- κ B y el consiguiente aumento en la expresión de NLRP3, ASC y caspasa-1. Una segunda señal, que abarca corrientes iónicas, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo o alteración del compartimento lisosomal, induce el ensamblaje de los componentes del inflamasoma y su activación. La caspasa-1 se activa y procesa pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus formas maduras, que son liberadas a través de los poros de GSDMD formados en la membrana celular, que también puede desencadenar la muerte celular inducida por piroptosis. Sin embargo, el inflamasoma NLRP3 puede responder a señales no infecciosas, como son ciertos mediadores de enfermedades cardiometabólicas o asociados al envejecimiento (oxLDL, colesterol, IAPP, NEFA), actuando como un amplificador de la señal inflamatoria subyacente a estas patologías. Figura diseñada con Biorender.

7. El eje adiposo-vascular

7.1. El tejido adiposo como órgano endocrino

El tejido adiposo ha dejado de considerarse un tejido relacionado únicamente con la termorregulación y el almacenaje energético en forma de ácidos grasos, para ser considerado el mayor órgano endocrino del organismo. El tejido adiposo libera gran cantidad de sustancias activas denominadas adipoquinas que controlan el metabolismo energético, la respuesta inmune y la homeostasis cardiovascular, entre otros efectos (Gu y Xu, 2013). A través de las adipoquinas, el tejido adiposo interactúa y modula el funcionamiento de otros órganos y tejidos como el músculo, el hígado, el tejido nervioso y la vasculatura. Especialmente se ha considerado que las adipoquinas median la conexión bidireccional entre el tejido adiposo y la pared vascular (Romacho et al., 2014), constituyendo el sistema estructural y funcional denominado eje adiposo-vascular (**Figura 6**).

En condiciones fisiológicas, es bien conocida la relación anatómica y funcional estrecha que unen al tejido adiposo y la vasculatura. Por un lado, el tejido adiposo está muy vascularizado y el mantenimiento de un flujo sanguíneo adecuado es esencial para abastecer al tejido y regular la función metabólica, la adipogénesis y el remodelado del tejido adiposo (Ye, 2011). Por otro lado, prácticamente todos los vasos sanguíneos están rodeados de tejido adiposo que produce gran cantidad de moléculas con actividad vasocrina (Chang et al., 2020). Además, se conoce la conexión estrecha que existe entre el crecimiento del tejido adiposo y el desarrollo del árbol vascular intratisular (Ye, 2011).

La distribución del tejido adiposo tiene un efecto directo en el estado metabólico del organismo. Por un lado, se ha determinado que el envejecimiento del tejido adiposo y la alteración de su perfil secretor, contribuyen a la progresión de las enfermedades metabólicas en la población mayor (Reyes-Farias et al., 2021). De hecho, desde hace años se ha reconocido que las intervenciones farmacológicas y conductuales que conllevan restricción calórica y pérdida de peso se asocian con un aumento de la esperanza de vida (Madeo et al., 2019; McClay et al., 1939). Por otro lado, en el contexto de la obesidad, el tejido adiposo se distribuye fundamentalmente en la región visceral y experimenta cambios desde el punto de vista metabólico, inmunológico y endocrino. La acumulación excesiva de grasa visceral está asociada con un mayor riesgo para el desarrollo de comorbilidades como el síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular y la aterosclerosis (Gruzdeva et al., 2018). Además,

se ha determinado que, en condiciones patológicas, la reducción de la angiogénesis en el tejido adiposo tiene un papel muy importante en el desarrollo de la inflamación crónica, la resistencia a la insulina y la enfermedad metabólica en la obesidad (Corvera y Gealekman, 2014). Cuando la densidad capilar en el tejido adiposo es insuficiente para abastecer la demanda de su crecimiento, se produce un estado de hipoxia local que termina por deteriorar también la microvasculatura cercana e incluso la de dentro del tejido.

Por tanto, se ha establecido que la hiperplasia del tejido adiposo y la hipertrofia de los adipocitos contribuyen a un estado de hipoxia que desencadena la inflamación del tejido y la consiguiente infiltración de células inmunes (Hagita et al., 2011). Los macrófagos infiltrados son responsables del aumento en la expresión local de mediadores inflamatorios como TNF- α , MCP-1, IL-6 o interferón (INF)- γ (Hagita et al., 2011). La inflamación es también causa y consecuencia de la alteración en el perfil de expresión de las adipoquinas. En la obesidad, se ha determinado un aumento significativo en la producción de adipoquinas, que además presentan mayoritariamente un perfil proaterogénico y proinflamatorio (**Figura 6**) (Romacho et al., 2014; Ouchi et al., 2011). Además, se ha propuesto que la desregulación en la producción de adipoquinas puede representar la unión entre las enfermedades metabólicas y sus complicaciones vasculares asociadas (Taube et al., 2012). Las adipoquinas alcanzan la pared vascular a través de la circulación, donde actúan de forma endocrina y paracrina para modular la regeneración endotelial, el tono vascular, la contractilidad cardíaca y ejercer efectos deletéreos. Por todo ello, el eje adiposo-vascular es un microambiente crítico en el que poder identificar mediadores producidos por el tejido adiposo disfuncional que contribuyan al envejecimiento vascular acelerado en la diabetes.

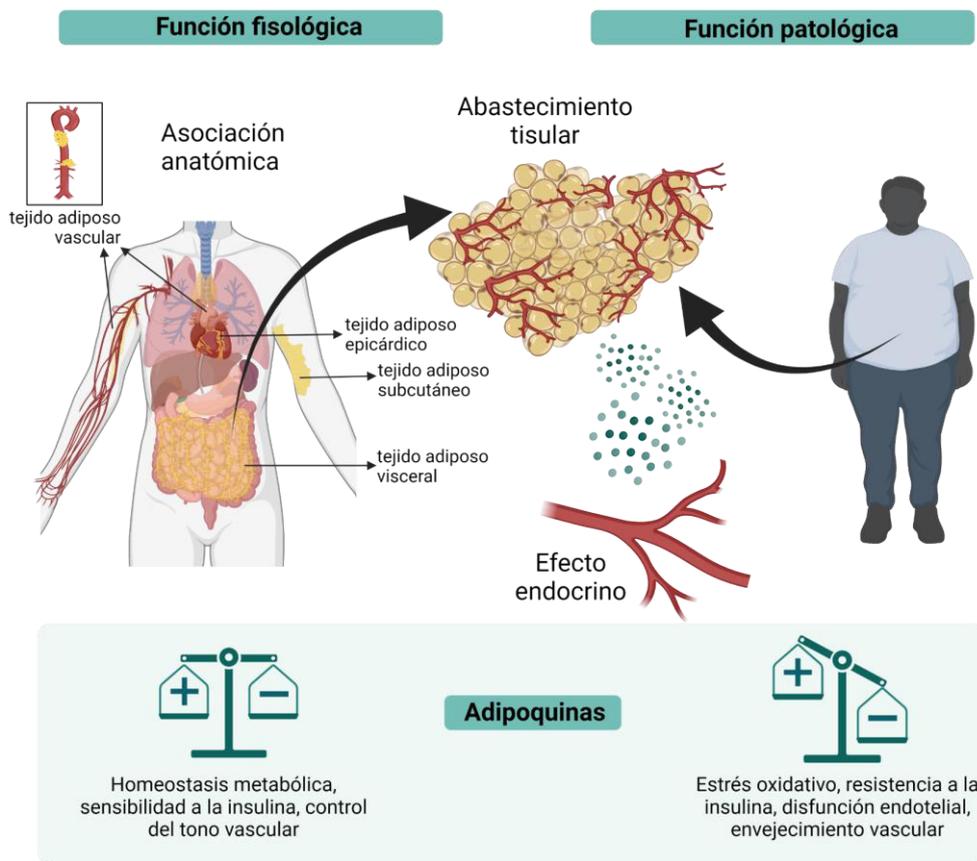


Figura 6. Función fisiopatológica del eje adiposo-vascular. En condiciones fisiológicas existe una conexión anatómica y funcional muy estrecha entre el tejido adiposo y la vasculatura, que se comunican bidireccionalmente. El tejido adiposo está muy vascularizado y se abastece de todo el árbol vascular intratisular, pero, además, ejerce un efecto endocrino a nivel sistémico a través de la liberación de adipoquinas al torrente sanguíneo. En condiciones patológicas, el perfil secretor del tejido adiposo está desequilibrado, con una liberación más intensa de adipoquinas con un perfil proinflamatorio y proaterogénico, que pueden alterar el funcionamiento vascular a nivel local y sistémico, e incluso promover el avance del envejecimiento vascular acelerado. Figura diseñada con Biorender.

7.2. Adipoquinas, senescencia y disfunción endotelial

Las adipoquinas contribuyen a la organización estructural y funcional del tejido adiposo, y además pueden ejercer efectos beneficiosos y deletéreos en la pared vascular y el endotelio en particular según el contexto fisiopatológico (Ouchi et al., 2011). Las adipoquinas están implicadas en el metabolismo de la glucosa (adiponectina, resistina), la inflamación (TNF- α , IL-6), la coagulación (PAI-1), la presión arterial (angiotensinógeno, angiotensina II) o el estado de saciedad (leptina) (Maresca et al., 2015). Como se ha mencionado anteriormente, en la diabetes se experimenta un aumento de los niveles plasmáticos de adipoquinas dañinas en detrimento de las protectoras, que contribuyen al daño vascular observado en estos pacientes. Por un lado, se ha identificado una producción disminuida de adiponectina, que tiene propiedades vasoprotectoras y antiaterogénicas (Han et al., 2007). En contraste, la producción aumentada de TNF- α , IL-6 y otras adipocitoquinas pueden activar vías de señalización proinflamatorias en las células vasculares, y se han asociado con un mayor nivel de mediadores proinflamatorios a nivel sistémico como hsCRP (Ouchi et al., 2011). Además, se ha demostrado que adipoquinas como visfatina (Villalobos et al., 2014), angiotensina II e IL-1 β (Romero et al., 2019) pueden desencadenar directamente la respuesta senescente de células endoteliales humanas y comprometer la función vascular de arterias mesentéricas murinas y humanas (Vallejo et al., 2011). Sin embargo, la evidencia acerca de la contribución de otras adipoquinas al proceso de envejecimiento vascular sigue siendo muy escasa.

8. La adipoquina dipeptidil peptidasa-4 (DPP4)

DPP4 (también denominada proteína acomplejante de la adenosina deaminasa 2, ADCP2, o “*cluster*” de diferenciación (CD)26), ha sido recientemente identificada como uno de los mediadores liberados por el tejido adiposo, y cuyos niveles plasmáticos se encuentran elevados en el contexto patológico de la obesidad y la DMT2 (Sell et al., 2013; Lamers et al., 2011). El interés en DPP4 como diana farmacológica radica en que los inhibidores de DPP4 (gliptinas) constituyen un grupo de fármacos empleados en el control de la glucemia en pacientes con DMT2. DPP4 inactiva las hormonas incretinas producidas a nivel intestinal, responsables mayoritarios de la liberación de insulina tras la ingesta. De esta forma, la inhibición de DPP4 permite prolongar el efecto insulínico de las incretinas y la reducción de los niveles de glucosa en sangre (Ussher y Drucker, 2012). A pesar de que las gliptinas se sintetizaron con el objetivo de prolongar la vida media de las incretinas y su beneficio en la homeostasis metabólica, hoy en día se ha reconocido que estas hormonas son una de las muchas dianas de DPP4, evidenciando que la funcionalidad de DPP4 es más compleja.

Se ha observado además que DPP4 ejerce efectos pleiotrópicos de forma independiente al catabolismo de las incretinas, incluidos efectos deletéreos sobre las células de la pared vascular (Röhrborn et al., 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene constancia de estudios que hayan demostrado que DPP4 pueda contribuir directamente al desarrollo del envejecimiento vascular. De identificarse, este sería un nuevo mecanismo que contribuiría al envejecimiento acelerado y que podría abordarse farmacológicamente gracias a la aprobación y uso clínico actual de hasta nueve gliptinas diferentes, seis de las cuales han sido aprobadas por la Agencia Europea del Medicamento (sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina y vildagliptina) (Deacon, 2011).

8.1. Biosíntesis y estructura de DPP4

DPP4 es una glicoproteína transmembrana de 766 aminoácidos y 110 kDa que se expresa de manera ubicua en el organismo. La estructura monomérica de DPP4 cuenta con una corta porción citoplasmática aminoterminal, un único dominio transmembrana de 22 aminoácidos y un dominio extracelular organizado, por un lado, en una región altamente glicosilada seguida una zona rica en cisteína, y por otro, en su principal dominio catalítico α/β -hidrolasa (**Figura 7**) (Klemann et al., 2016). DPP4 existe como monómero, homodímero u homotetrámero en la superficie celular (Zhong et al., 2013). Su actividad peptidasa permite

hidrolizar dipéptidos con prolina, alanina o serina como penúltimo residuo en el extremo amino terminal de una amplia variedad de sustratos, como péptidos, citoquinas, interleuquinas y hormonas (**Figura 7**).

La actividad dipeptidil peptidasa también puede ser detectada en plasma, debido a la existencia de una forma soluble de DPP4 (sDPP4), la cual carece de las regiones citoplasmática e intracelular de la proteína, aunque mantiene su centro activo intacto (Klemann et al., 2016). El mecanismo de liberación de sDPP4 no se comprende en su totalidad. Se ha determinado que la liberación de sDPP4 no sigue un mecanismo clásico de secreción, sino que la proteína sería liberada desde la membrana plasmática en un proceso de escisión. Las enzimas metaloproteinasas (MMP)-4, KLK5 o ADAM-17 mediarían su liberación desde la membrana plasmática, de una forma específica según el tipo celular (Röhrborn et al., 2014; Nargis et al., 2017).

En el contexto de la diabetes, tanto el tejido adiposo (Romacho, Sell et al., 2020; Sell et al., 2013; Lamers et al., 2011) como el hígado (Ghorpade et al., 2018; Baumeier et al., 2017) han sido propuestos como fuentes relevantes de la porción de sDPP4 circulante en estos pacientes. Respecto al tejido adiposo, se ha identificado que sDPP4 es liberado principalmente desde el depósito visceral en comparación con el tejido adiposo subcutáneo en pacientes obesos o con evidencia clínica de insulino-resistencia. Además, los niveles plasmáticos de sDPP4 correlacionan con el IMC, el tamaño de los adipocitos y los niveles de marcadores proinflamatorios entre los que destaca la hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Sell et al., 2013; Lamers et al., 2011).

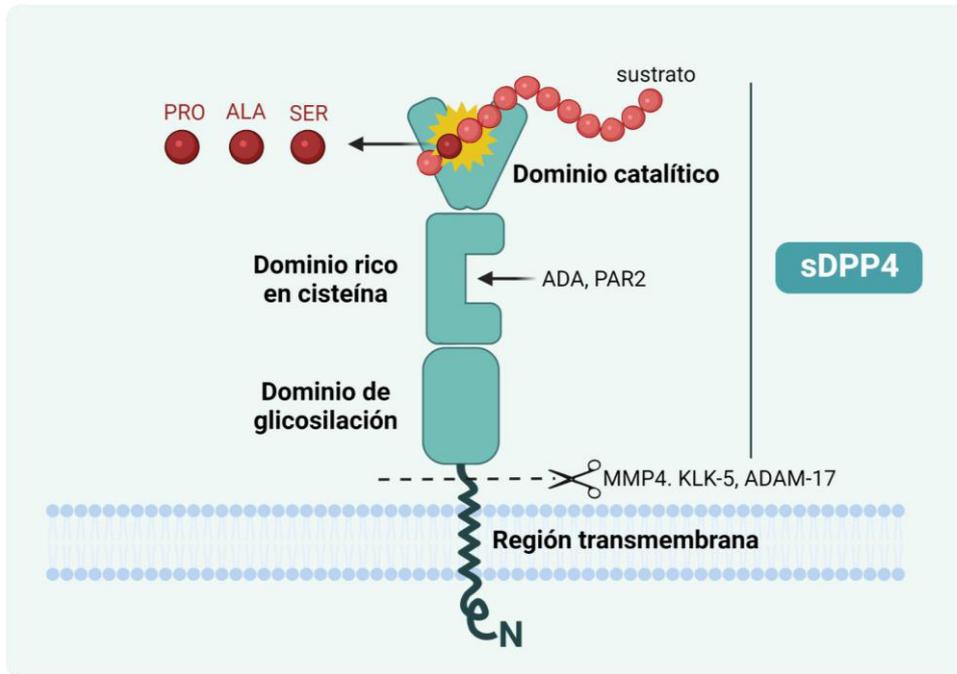


Figura 7. Estructura molecular de DPP4. DPP4 se ancla a la membrana plasmática a través de un único dominio transmembrana, diferenciando una corta porción citoplasmática aminoterminal, y una región extracelular carboxilo terminal dividida en: dominio catalítico (aminoácidos, aa 506-766), dominio rico en cisteínas (aa 55-100, 351-497) y dominio de glicosilación (aa 101-350). El dominio catalítico media su actividad serín-proteasa, por la cual libera dipéptidos de sustratos que portan prolina, alanina o serina en su penúltima posición. Por su parte, el dominio rico en cisteína media la unión de DPP4 a otros factores y receptores. La forma soluble (sDPP4) abarca prácticamente toda la estructura de la forma anclada, a excepción de la región intracelular y transmembrana. sDPP4 puede ser escindida de la membrana plasmática por las enzimas MMP4, KLK-5 o ADAM-17. Figura diseñada con Biorender.

8.2. Funciones de DPP4

La principal función conocida de DPP4 es su papel como regulador de los niveles de glucosa postprandial mediante la degradación de las hormonas incretinas intestinales denominadas péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y péptido inhibidor gástrico (GIP) (Ussher y Drucker, 2012). GLP-1 y GIP son liberados por las células L y K intestinales y estimulan la secreción de insulina, ralentizan la motilidad y el vaciado gástrico y reducen el apetito. Las incretinas son responsables de hasta el 60% de la liberación de insulina tras la ingesta, además GLP-1 suprime la producción de glucagón (Röhrborn et al., 2015) y, por ello, contribuyen al control de la glicemia. Sin embargo, la vida media de GLP-1 y GIP es de apenas dos o siete minutos respectivamente, dado que la porción gástrica de DPP4 las cataboliza e inactiva rápidamente.

Los ratones deficientes en el gen de DPP4 son resistentes al desarrollo de obesidad e hiperinsulinemia y demuestran un estricto control de la liberación de glucosa tras la ingesta (Marguet et al., 2000). Tanto la delección genética completa de DPP4 como el tratamiento con inhibidores de su actividad enzimática han demostrado el aumento sistémico de los niveles de GLP-1 y GIP (Röhrborn et al., 2015). Por su parte, los ratones deficientes en DPP4 exclusivamente a nivel del tejido adiposo visceral, no experimentaron cambios significativos en los niveles de incretinas, aunque sí una mejora en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo hepático al ser alimentados con dieta alta en grasa (Romacho, Sell et al., 2020). Por tanto, se ha determinado que el aumento del nivel de incretinas no puede explicar por sí solo el impacto positivo de las gliptinas en el sistema cardiovascular, la inflamación crónica o el funcionamiento hepático, por lo que se ha determinado que los efectos directos de DPP4 cumplen un papel relevante en este contexto.

Más allá de sus efectos dependientes de incretinas, la funcionalidad de DPP4 es compleja. A través de su actividad enzimática, metaboliza y trunca la actividad de gran variedad de sustratos. Además, sin participación de su actividad proteasa, sirve de molécula de unión y señalización junto a otros marcadores de superficie. Por otro lado, la forma soluble mantiene su actividad enzimática y dominios de unión intactos, además de activar otros receptores de superficie (**Figura 8**). Algunos de los sustratos de la actividad enzimática de DPP4 son el factor derivado de células estromales (SDF1- α), el neuropéptido NPY, el ligando 5 de quimioquinas (CCL5/RANTES), o el péptido natriurético cerebral (BNP), moléculas con capacidad quimiotáctica para las células del sistema inmune (Klemann et al., 2016) o con impacto directo en el sistema cardiovascular (Brandt et al., 2006). El producto de la proteólisis por DPP4 de estos mediadores suele ser un factor truncado que tiene menos afinidad que la forma completa por su receptor o, incluso, que se une a nuevos receptores por los cuales ejerce una nueva acción (Zhong et al., 2013). Esto implica que DPP4 inhibe la actividad inmunomoduladora de estos factores y puede activar ciertas vías proinflamatorias y angiogénicas (Klemann et al., 2016) o alterar la regulación del tono vascular y el trabajo cardíaco (**Figura 8**) (Brandt et al., 2006).

DPP4 presenta funciones no enzimáticas en las que actúa como proteína de señalización e interacción intermolecular como CD26, expresado en las células mieloides del sistema inmune. La expresión de CD26 se incrementa de acuerdo al estado madurativo y activado de los monocitos a células dendríticas y macrófagos, donde estimula la expresión de CD86 y su

Introducción

acción como células presentadoras de antígenos (Klemann et al., 2016). La unión de CD26 a otras moléculas también desencadena la activación, proliferación y señalización proinflamatoria de los linfocitos T. En este escenario, CD26 actúa tanto de forma independiente o mediante la interacción con otras moléculas inmunomoduladoras situadas en las células presentadoras de antígenos como son CD45, caveolina-1 (Cav-1), el receptor de manosa-6-fosfato (M6PR) o la adenosina deaminasa (ADA) (**Figura 8**) (Zhong et al., 2013). Por otro lado, también hay estudios que han evidenciado la capacidad de DPP4 para interactuar a través de su dominio rico en cisteína con proteínas de la matriz extracelular como colágeno, fibronectina, plasminógeno y estreptoquinasa (Klemann et al., 2016), desencadenando fenómenos de migración celular y remodelado tisular (**Figura 8**).

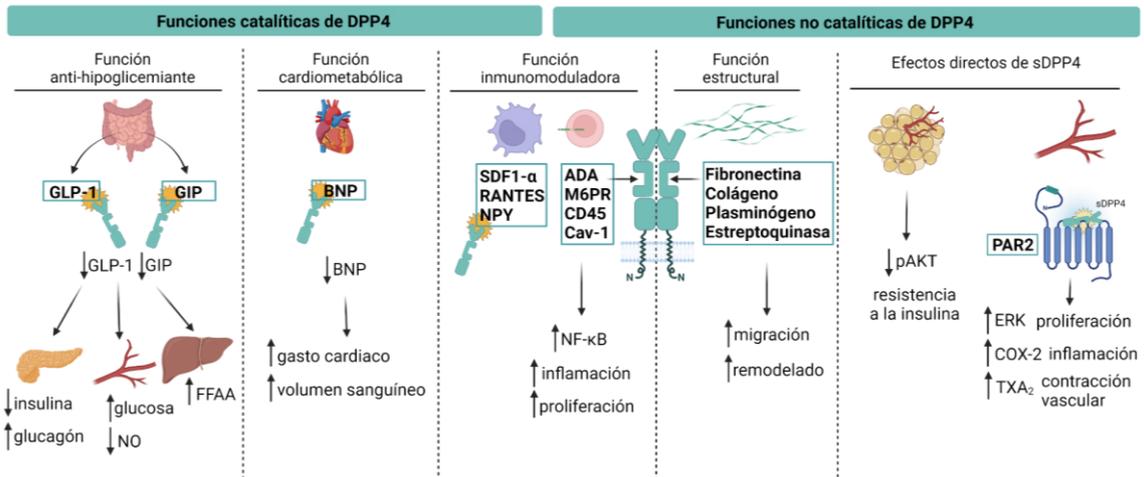


Figura 8. Esquema sobre las funciones fisiológicas de DPP4. DPP4 presenta funciones pleiotrópicas en el organismo dependiendo de los sustratos que proteoliza (funciones catalíticas) o las moléculas con las que interactúa (funciones no catalíticas). En la figura se muestran las principales funciones y efectos potenciales tanto de DPP4 como de su forma soluble (sDPP4), en diferentes sistemas y órganos. Figura diseñada con Biorender.

8.3. sDPP4 y la pared vascular

La mayoría de las acciones atribuidas a DPP4 sobre la pared vascular se han determinado en función de los efectos beneficiosos de sus inhibidores tanto *in vivo* como *in vitro*. Mientras que el tratamiento con gliptinas disminuye la aterosclerosis en ratones diabéticos mediante sus efectos antioxidantes (Duan et al., 2017), se ha observado un rápido aumento en la producción de NO en células endoteliales expuestas a gliptinas (Deacon et al., 2006). Además, la inhibición de DPP4 mejoró la reactividad vascular de segmentos aórticos de forma independiente al efecto de las incretinas (Zhong et al., 2015).

Nuestro grupo de investigación y colaboradores ha sido pionero en demostrar que sDPP4 ejerce acciones deletéreas directas sobre la pared vascular. Se ha propuesto que sDPP4 contribuye de manera directa al desarrollo de la aterosclerosis, ya que es capaz de inducir la proliferación de células de músculo liso vascular *in vitro* y estimular la secreción de citoquinas proinflamatorias (Wronkowitz et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que sDPP4 empeora la relajación dependiente de endotelio de arterias mesentéricas murinas, estimulando la producción de agentes protrombóticos por el endotelio (Romacho et al., 2016).

A pesar de que la naturaleza del receptor por el que sDPP4 ejerce su acción se mantiene bajo discusión, debido a la gran variedad de sustratos y proteínas de superficie a las que potencialmente podría unirse, el análisis estructural de DPP4 ha sugerido que, al menos en adipocitos y células vasculares, puede actuar como agonista del receptor de tipo metabotrópico activado por proteinasas 2 (PAR2, *proteinase activated receptor 2*) (Wronkowitz et al., 2014). Precisamente, este receptor con siete dominios transmembrana ha sido implicado anteriormente como mediador de la disfunción metabólica y la inflamación crónica en la obesidad (Lim et al., 2013). Cabe destacar que DPP4 activa a PAR2 de forma independiente a su actividad proteasa (Wronkowitz et al., 2014). Mientras que la proteólisis de una región específica de los receptores PAR puede descubrir un ligando oculto (*tethered ligand*) que activa al receptor, también cabe la posibilidad de que un péptido que porte la misma secuencia que la del ligando active al receptor directamente (Kagota et al., 2016). Se ha determinado que la secuencia de DPP4 tiene un alto grado de homología con los primeros aminoácidos (secuencia SLIG) del ligando activador de PAR2, y esta sería su forma de interacción con el receptor (**Figura 9**) (Wronkowitz et al., 2014).

Introducción

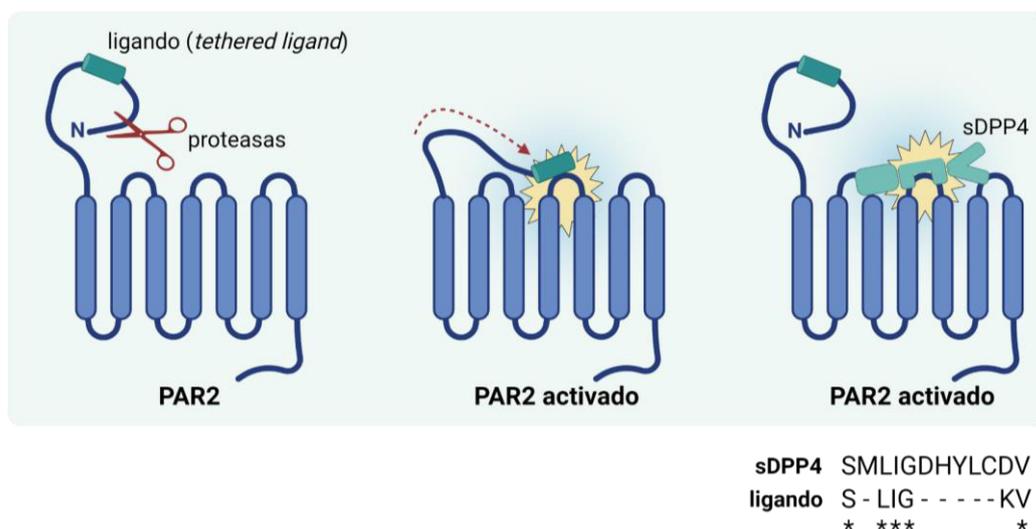


Figura 9. Activación del receptor PAR2 por sDPP4. sDPP4 presenta una alta homología con la secuencia de aminoácidos SLIG del ligando oculto (*tethered ligand*) del receptor PAR2. La actividad proteolítica de tripsina y otras proteasas puede modificar la estructura del receptor y liberar este ligando oculto, que se une al segundo bucle extracelular de PAR2 para activarlo. Sin embargo, se ha establecido que, al igual que algunos péptidos sintéticos que portan la secuencia SLIG pueden activar directamente a PAR2 sin necesidad de proteólisis, sDPP4 podría unirse al receptor y activarlo sin necesidad de emplear su actividad enzimática. Figura diseñada con Biorender.

DPP4 se expresa en las células endoteliales y de músculo liso vascular tanto *in vitro* como *in vivo* (Röhrborn et al., 2015). Se ha observado que las condiciones hipóxicas y algunos estímulos pro-senescentes aumentan la expresión de DPP4 en la superficie celular, donde se ha determinado que sirve como señal para la eliminación de estas células por el sistema inmune (Kim et al., 2017; Röhrborn et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la importancia de la adipocina DPP4 en algunas alteraciones metabólicas y vasculares asociadas a la diabetes, no hay evidencias que hayan estudiado el papel directo de DPP4 en la senescencia endotelial en particular y el envejecimiento vascular en general.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Las enfermedades vasculares son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en la diabetes, condición que constituye un problema actual de salud global. Los pacientes obesos y diabéticos presentan alteraciones estructurales y funcionales en la pared de los vasos sanguíneos que se asemejan a los cambios asociados al envejecimiento. Por ello, ambas enfermedades se han considerado condiciones progericas que aceleran el envejecimiento vascular. En busca de nuevas dianas terapéuticas sobre las que dirigir estrategias farmacológicas para prevenir y ralentizar el envejecimiento vascular prematuro en la diabetes, las adipocinas se presentan como un candidato interesante. Nuestro grupo de investigación y colaboradores ha identificado precisamente a la adipocina sDPP4 como uno de los factores cuyos niveles aparecen descompensados en los pacientes obesos y diabéticos, y que puede ejercer efectos deletéreos directos sobre la pared vascular. Sin embargo, si sDPP4 participa en el contexto del envejecimiento vascular y de qué manera podrían estos efectos bloquearse farmacológicamente, son cuestiones que no han sido analizadas hasta la fecha. En este trabajo, se ha estudiado la implicación de DPP4 en las alteraciones fisiopatológicas del envejecimiento vascular que afectan al endotelio, como son la senescencia y la disfunción endotelial. Nuestra hipótesis es que la adipocina sDPP4 es un nuevo efector del envejecimiento vascular acelerado, que podría abordarse farmacológicamente. Los inhibidores de DPP4 (gliptinas) se emplean actualmente en clínica para el control de la glucemia en pacientes con DM2, y los resultados de este trabajo podrían ampliar el enfoque terapéutico de estos fármacos, que ya han demostrado otros efectos protectores en el sistema cardiovascular.

El objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido determinar el posible papel desempeñado por la adipocina sDPP4 en el envejecimiento vascular prematuro que se observa en el contexto patológico de la diabetes. Para ello, se han definido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si sDPP4 puede inducir una respuesta senescente en células endoteliales humanas, explorando los mecanismos intracelulares subyacentes y, especialmente, el papel del inflamasoma NLRP3.
2. Evaluar el efecto del bloqueo farmacológico de la actividad enzimática de DPP4 y de sus mecanismos activados, sobre el efecto pro-senescente inducido por sDPP4.

Objetivos e Hipótesis

3. Explorar el efecto de sDPP4 en la disfunción endotelial *ex vivo* de arterias de resistencia humanas.
4. Analizar el efecto del bloqueo farmacológico de la actividad enzimática de DPP4 o de los mediadores de su efecto pro-senescente en la función vascular de arterias de resistencia humanas.
5. Estudiar, en el contexto patológico de la obesidad humana, la función vascular de las arterias mesentéricas derivadas de biopsias de tejido adiposo visceral de una cohorte de pacientes obesos, en comparación con pacientes control.
6. Analizar en biopsias de grasa visceral humana de sujetos obesos la posible expresión de DPP4 y marcadores de senescencia, en comparación con las de pacientes control.
7. Determinar la implicación de DPP4 en la disfunción endotelial observada en la obesidad humana, analizando si el bloqueo farmacológico de DPP4 o de sus mecanismos pro-senescentes puede tener un efecto beneficioso sobre la función vascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

Las células endoteliales humanas empleadas en esta tesis fueron aisladas a partir de cordones umbilicales de madres donantes con una cesárea programada en el Hospital Universitario La Paz de Madrid (España). Fueron excluidas del estudio aquellas madres con antecedentes médicos o evidencia clínica de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 1 o tipo 2 u obesidad. El procedimiento de recogida y aislamiento descrito a continuación ha sido revisado y aprobado por los correspondientes comités éticos del Hospital Universitario La Paz y la Universidad Autónoma de Madrid.

Posteriormente a la firma del pertinente consentimiento informado por parte de las madres donantes, el personal sanitario recogió un fragmento de unos 15-20 cm de longitud de cordón umbilical durante la cesárea. El tejido se mantuvo en frascos estériles con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biological Industries, Gotinga, Alemania), suplementado con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA), 0,05% de heparina sódica, 2 mmol/l de L-glutamina (ambos de Sigma, Missouri, EE.UU.), penicilina 100 u/ml (Penilevel laboratorios ERN S.A., Barcelona, España), estreptomina 100 µg/ml (Laboratorios Reig-Jofré, Barcelona, España) y anfotericina 2,5 µg/ml (Sigma), hasta su procesamiento.

Una vez en el laboratorio, el cordón umbilical se lavó con tampón fosfato salino (PBS) estéril para eliminar los posibles restos de sangre exterior. Se canuló la vena umbilical con una jeringa de 5 ml y a través de esta se inyectó PBS a presión moderada. El extremo distal del cordón se cerró con una pinza de clampaje para la posterior inyección de colagenasa tipo II (2 mg/ml) diluida en PBS. Se clampó también el extremo superior del cordón y se incubó durante 18 minutos a temperatura ambiente (**Figura 10**).

Después de la incubación, se realizó un corte transversal del cordón por encima de la pinza inferior y las células endoteliales desprendidas se recogieron en una placa Petri por medio de lavados continuos a través de una nueva jeringa canulada. El extracto celular se transfirió a un nuevo tubo con 20 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, Biological Industries), L-glutamina y antibióticos para neutralizar la actividad colagenasa. Se centrifugaron las células a 1800 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Ortoalresa Digtor (Madrid, España). El precipitado celular se lavó con nuevo medio DMEM en una segunda centrifugación a 1100 rpm durante 10 minutos. El precipitado celular

Materiales y Métodos

se homogenizó en medio de cultivo M199 (Biological Industries) suplementado con 20% FCS, 25 µg/ml de factor de crecimiento endotelial (ECGS, Sigma), 10 µg/ml de heparina sódica, 2 mmol/l de L-glutamina y antibióticos (100 u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2,5 µg/ml anfotericina B).

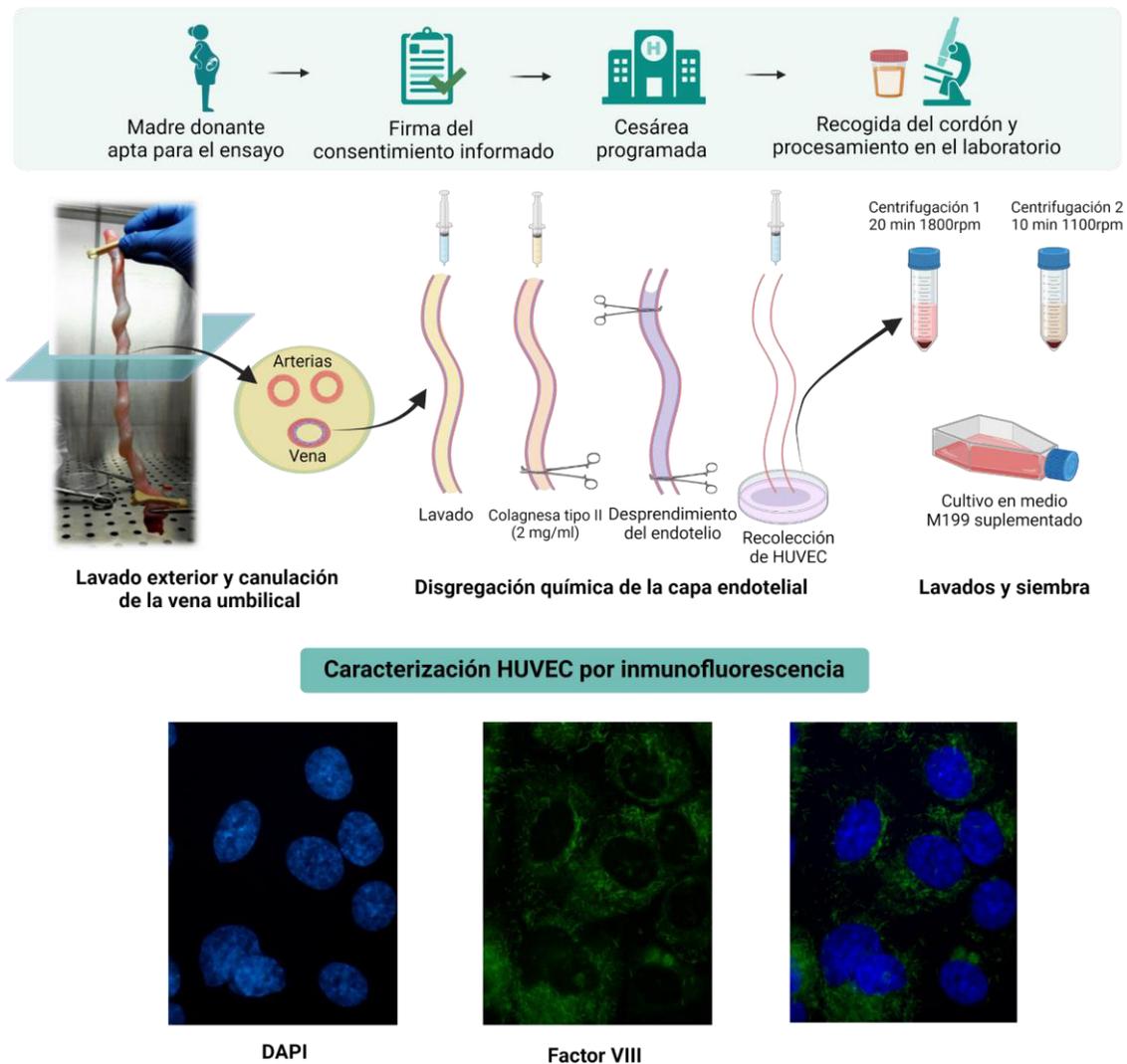


Figura 10. Esquema del procedimiento de aislamiento de HUVEC mediante disgregación enzimática de la capa endotelial. Quincenalmente se recibieron de 1 a 3 cordones umbilicales en el laboratorio para la extracción y cultivo primario de HUVEC. Tras la firma del consentimiento informado, los cordones se procesaron en el laboratorio. Se canuló la vena umbilical y se desprendieron las células endoteliales por disgregación enzimática con colagenasa tipo II. Las HUVEC se caracterizaron según su morfología y expresión del factor VIII de coagulación. Figura diseñada con Biorender.

Las HUVEC se sembraron en frascos F75 previamente cubiertos con una solución de colágeno tipo 1 en ácido acético 0,1 mol/l (Sigma) para la correcta adherencia de las células. El cultivo se mantuvo en un incubador Napco modelo 5415 (Nueva York, EE.UU.) a 37°C, atmósfera saturada en H₂O y 5% de CO₂. La dinámica del cultivo celular se muestra en la **Figura 11**.

De forma rutinaria, las células fueron caracterizadas en base a su aspecto morfológico y por la detección por inmunofluorescencia indirecta del factor Von Willebrand o factor VIII de coagulación (**Figura 10**). El principio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se detalla más adelante. Concretamente para la caracterización de las HUVEC se empleó el anticuerpo frente a factor VIII de la casa comercial DAKO (Glostrup, Dinamarca).

El día siguiente a la siembra, se lavaron las células con PBS y se cambió el medio de cultivo para eliminar todos los posibles restos celulares no adherentes, principalmente hematíes. El cultivo celular se mantuvo con cambios de medio regulares cada dos días hasta que alcanzó una confluencia entre el 80-90%. En este punto, se levantaron las células con una solución de tripsina y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0,05% y se sembraron para los experimentos pertinentes según la densidad y soporte especificados en cada caso. Cuando se alcanzó la confluencia deseada, las células recibieron los tratamientos pertinentes en medio de cultivo al que se redujo a la mitad el contenido en FCS durante el tiempo de duración del tratamiento (18 o 24 horas). Para el tratamiento se empleó sDPP4 recombinante humana (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.), IL-1 β (PeproTech, Londres, Reino Unido), linagliptina (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania), GB83 (Axon Medchem, Groningen, Países Bajos), anakinra (Biovitrum, Estocolmo, Suecia), indometacina, celecoxib, SQ 29,548, U46619 y MCC950 (Sigma). El medio de tratamiento M119 al 10% de FCS también se suplementó con L-glutamina, ECGS y antibióticos como se ha indicado anteriormente. El cultivo primario de HUVEC se realizó quincenalmente en el laboratorio y los experimentos mostrados se realizaron en células entre pases 1 y 4.

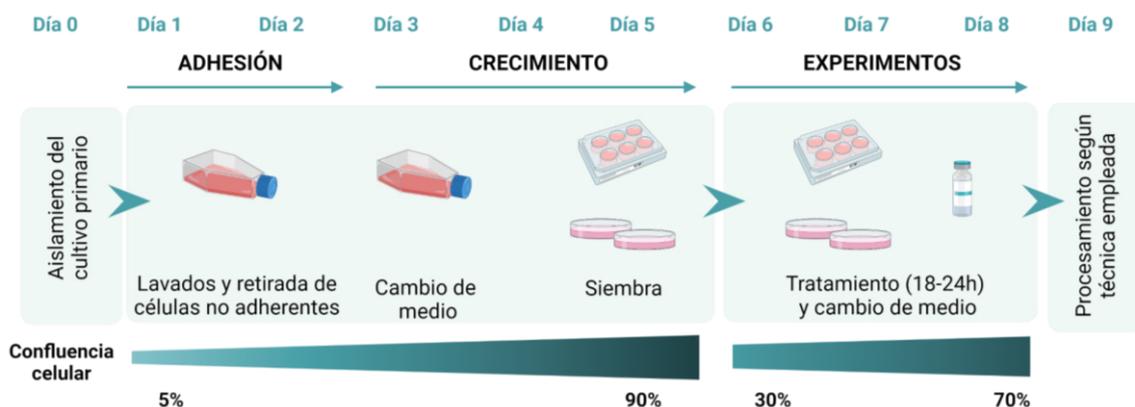


Figura 11. Esquema de la dinámica de cultivo celular de HUVEC. Desde el inicio del aislamiento del cultivo primario desde el cordón umbilical, se necesitaron al menos 4 días con cambios continuos de medio de cultivo M199 20% FCS cada 48 horas para la correcta adhesión y crecimiento de las HUVEC. Entre el día 5 y 6 se levantaron las células para sembrarlas en el soporte adecuado según cada experimento. Una vez alcanzaron la confluencia adecuada, las HUVEC fueron expuestas a los tratamientos pertinentes en presencia de medio M199 10% FCS durante 18 o 24 horas. Figura diseñada con Biorender.

2. Ensayo de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia

Una de las características del fenotipo senescente, independientemente del tipo celular, es el aumento del contenido y actividad lisosomal en las células senescentes en comparación con las células proliferantes, quiescentes o diferenciadas (Kurz et al., 2000). Por ello, se han desarrollado test colorimétricos basados en la expresión diferencial de la enzima lisosomal β -galactosidasa, que se emplean como un método fiable para la detección específica de células senescentes. En este caso, el protocolo de tinción se realizó siguiendo las instrucciones del kit comercial de la casa comercial Sigma "Senescent Cell Histochemical Staining Kit".

El principio del kit es la detección de la actividad β -galactosidasa por medio de la hidrólisis del sustrato cromogénico y sintético 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, el cual es oxidado a 5-5'-dibromo-4-4'-índigo, compuesto de color azul visible en el interior de las células con mayor actividad β -galactosidasa (**Figura 12**).

Al contrario que la enzima hidrolasa lisosomal D-galactosidasa, presente en todas las células, donde funciona a un pH óptimo en un rango ácido (4.0-5.0), la enzima galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) presenta su actividad óptima a un pH en torno a 6.0. Cuando el ensayo de tinción de β -galactosidasa se realiza a un pH 4.0, todas las células se tiñen intensamente. Sin embargo, a pH 6.0, la actividad enzimática de la hidrolasa lisosomal constitutiva es muy débil y no puede detectarse, mientras que todas aquellas células que presentan un aumento en la actividad SA- β -gal mostrarán una tinción positiva y podrán ser cuantificadas como células senescentes.

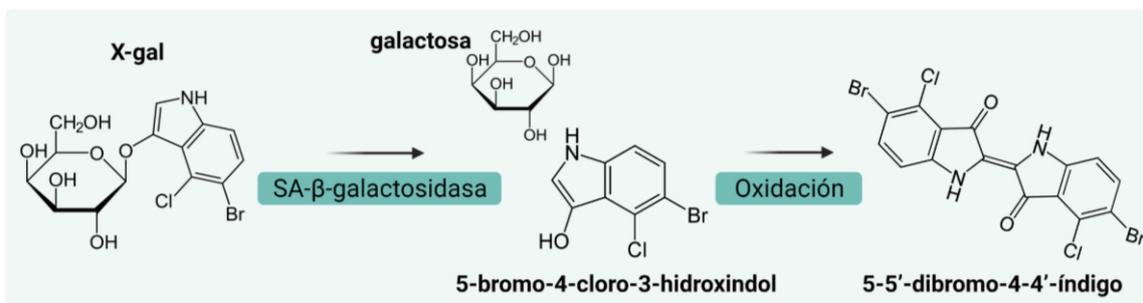


Figura 12. Esquema de las reacciones que fundamentan el método de detección de células senescentes de acuerdo a su actividad SA- β -gal. En condiciones óptimas de pH, la enzima SA- β -gal es capaz de hidrolizar el compuesto X-gal, que lleva asociado un radical cromogénico. El producto de la hidrólisis puede ser oxidado a 5-5'-dibromo-4-4'-indigo, un compuesto de color azul. Las células senescentes con mayor actividad SA- β -gal serán detectadas por el color azul que adquieren en el cultivo tras la tinción. Figura diseñada con Biorender.

Para este ensayo, las HUVEC se sembraron en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaron el 70% de confluencia, cuando se expusieron durante 24 horas a los tratamientos indicados. Este es un punto crítico, dado que el excesivo contacto entre células puede inducir senescencia y por tanto dar lugar a resultados falsos positivos.

Pasado el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS para su posterior fijación a temperatura ambiente durante 6 minutos con el tampón de fijación del kit compuesto por 20% formaldehído, 2% glutaraldehído, 70,4 mmol/l Na_2HPO_4 , 14,7 mo/l KH_2PO_4 , 1,37 mol/l NaCl y 28,8 mmol/l KCl. Después de la fijación, las células se lavaron tres veces con PBS y se cubrieron con la solución de tinción establecida a pH 6.0 y compuesta por 400 mmol/l de ferricianina potásica, 400 mmol/l de ferrocianina potásica y 40 mg/ml de solución X-gal. Las placas fueron empaquetadas para su protección adecuada de

Materiales y Métodos

la luz y el aire, y se incubaron durante 12-16 horas a 37°C en un incubador libre de CO₂, debido a que la tinción es pH dependiente, como se ha explicado más arriba. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se cubrieron con 70% glicerol para preservar la tinción a 4°C durante varios meses.

El porcentaje de células SA-β-gal positivas teñidas en azul con respecto a las células totales en cada tratamiento, se determinó por contaje manual ciego de al menos 1000 células en cada condición en un microscopio Nikon Eclipse TE300 (Tokio, Japón) con un aumento 200X en modo de contraste de fase. Las imágenes se tomaron con una cámara Nikon DS-U3 conectada al software NIS-Element 4.50.

3. Western blot

Se empleó la técnica de Western blot para la detección de los niveles de expresión de ciertas proteínas de interés en los lisados celulares. El fundamento de la técnica se basa en la extracción y desnaturalización de proteínas de una muestra, su separación en función de su peso molecular y su detección en un soporte membranoso con el uso de anticuerpos específicos cuya señal puede captarse en un analizador de imagen (**Figura 13**).

3.1. Obtención de los extractos proteicos

Las HUVEC se sembraron a una densidad de 6000 células por cm² en placas Petri de 60 mm de diámetro y se trataron con los estímulos indicados en cada caso durante 18 horas. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante del cultivo (aproximadamente 1,5 ml) y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5415R (Hamburgo, Alemania). Así, se retiraron los posibles restos de células desprendidas y los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C hasta el análisis de la concentración de ciertas citoquinas por el método ELISA descrito más adelante.

Por su parte, los lisados proteicos se obtuvieron añadiendo a cada una de las placas 80 µl de tampón de lisis (compuesto por 25 mmol/l Tris a pH 7.9, 0,5 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato sódico, 2 mmol/l fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 12,5 µg/ml aprotinina) y levantando las células mecánicamente con un rascador de plástico y en hielo. Los lisados celulares se mantuvieron a 4°C durante 15 minutos para posteriormente ser centrifugados a 13000 rpm durante 1 minuto a 4°C una centrífuga Eppendorf 5415R. Se recogió la fase acuosa

en un nuevo tubo, de donde se cuantificó el contenido proteico siguiendo el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Fisher Scientific, Illinois, EE.UU.).

3.2. Cuantificación de la concentración de proteína por el método de BCA

El método de BCA se basa en la detección de proteínas en una solución básica de acuerdo al principio de la reacción de Biuret. El BCA es una sal sódica capaz de formar un complejo con las proteínas en una muestra, dando como resultado la reducción de iones cúpricos (Cu^{+2}) del reactivo a iones cuprosos (Cu^{+1}), que adquieren un color morado en medio básico (Olson, 2016). La intensidad de la coloración es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos y por ende a la concentración de proteínas en la muestra.

El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones de un kit comercial (Pierce BCA™, Thermo Fisher Scientific). En una placa de 96 pocillos se realizó una dilución 1:1 en agua de cada muestra por duplicado, así como una curva patrón con BSA en concentraciones crecientes (0,1 - 2 mg/ml). Se añadieron a cada pocillo 200 μl de un reactivo comercial compuesto por dos soluciones. La placa se dejó incubar en la estufa a 37°C en oscuridad durante 30 minutos. Se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech. Ortenber, Alemania). La concentración proteica se determinó por intrapolación con los datos de absorbancia obtenidos en la curva patrón de concentraciones conocidas de BSA.

Materiales y Métodos

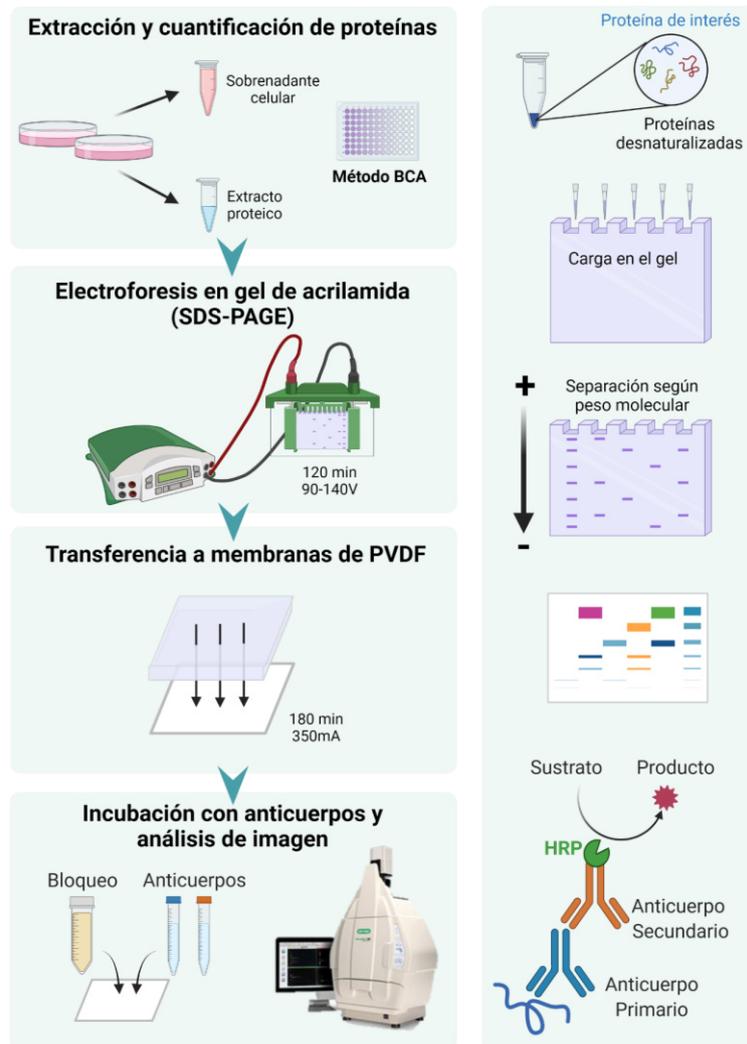


Figura 13. Principio de la técnica de detección de la expresión de proteínas por Western blot. Se obtuvieron lisados celulares de HUVEC tratadas según interés, se desnaturalizaron las proteínas y se separaron según su peso molecular por electroforesis en gel. Las proteínas de interés se detectaron por transferencia a un soporte de membranas de PVDF, el bloqueo y la incubación con anticuerpos específicos. Figura diseñada con Biorender.

3.3. Electroforesis en gel, transferencia y detección de proteínas

Se realizaron los cálculos pertinentes y se tomó el volumen de muestra requerido para contener 20 µg de proteína, que se mezcló en proporción 1:3 con tampón de carga Laemmli (compuesto por 125 mmol/l Tris, 2% dodecilsulfato sódico (SDS), 5% glicerol, 1% β-mercaptoetanol y 0,025% azul de bromofenol). Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95°C durante 5 minutos en un termobloque de Thermo Scientific™. El lisado proteico fue cargado en geles de acrilamida/bisacrilamida 37:1 (BioRad, California, EE.UU.) y separado por el método de electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) durante 120 minutos aproximadamente, con una corriente continua de 90-140 V. Posteriormente, se transfirió la separación proteica a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con poro de 0,45 µm de diámetro (Merck, Darmstad, Alemania), mediante el método de transferencia húmeda con una corriente a amperaje 350 mA constante durante 3 horas. Seguidamente, se bloquearon las membranas durante una hora con una solución al 5% de leche en polvo desnatada o BSA en un tampón salino, formado por 0,01 mol/l de Tris (pH 7.5), 0,1 mol/l de NaCl y 0,01% Tween-20.

Las proteínas de interés fueron detectadas con los anticuerpos primarios recogidos en la **Tabla 2**, seguidos de los correspondientes anticuerpos secundarios especie-específicos asociados a peroxidasa de rábano (HRP), también recogidos en la **Tabla 2**. Las bandas inmunoreactivas de los anticuerpos se detectaron por quimioluminiscencia con el kit de detección ECL (BioRad). Se tomaron imágenes de las membranas en un analizador de imagen ChemiDoc XRS+ (BioRad). Las imágenes fueron analizadas por densitometría empleando el software gratuito Fiji ImageJ 1.51w (Schindelin et al., 2012). Los niveles proteicos de los marcadores de interés fueron normalizados respecto a la intensidad de señal de la proteína β-actina constitutiva.

Tabla 2. Anticuerpos empleados para la detección de proteínas por Western blot.

Antígeno diana	Casa comercial	Especie	Dilución de trabajo
γH2AX (Ser139)	Cell Signalling Tech. (Massachusetts, EE.UU., Ref: 2577S)	Conejo	1/1000
p53	Santa Cruz BT (Texas, EE.UU., Ref: sc-126)	Ratón	1/1000
p21	Santa Cruz BT (Ref: sc-6246)	Ratón	1/500
Phospho-NF-κB (Pp65, ser536)	Cell Signalling Tech. (Ref: 3033S)	Ratón	1/1000
NLRP3	AdipoGen Life Sciences (San Diego, EE.UU., Ref: AG-20B-0014)	Ratón	1/1000
ASC	Enzo Life Sciences (Nueva York, EE.UU., Ref: ADI-905-6515)	Conejo	1/1000
Pro-IL-1β	R&D Systems (Ref: AF-401-NA)	Cabra	1/1000
Caspasa-1	Novus biologicals (Minnesota, EE.UU., Ref: 14F468)	Conejo	1/1000
β-Actin	Sigma (Ref: A3854)	Ratón	1/25000
IgG anti-cabra	Bethyl Laboratories (Texas, EE.UU., Ref: A50-201P)	Burro	1/10000
IgG anti-conejo	Bio-Rad (Ref: 170-6515)	Burro	1/10000
IgG anti-ratón	Merck (Ref: AP127P)	Cabra	1/10000

4. Determinación de la actividad NADPH oxidasa por quimioluminiscencia

Para el estudio de la actividad enzimática NADPH oxidasa, las células se sembraron en placas de 6 pocillos. Una vez confluentes, las HUVEC se trataron durante 18 horas con los tratamientos indicados y se procedió con el protocolo de lisis. En este caso, las células se levantaron mecánicamente empleando PBS frío y se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5415R. Se descartó la fase acuosa y el agregado de células fue disgregado en un tampón de homogenización a pH 7.0 compuesto por 5 mmol/l KH_2PO_4 , 1 mmol/l ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) y 150 mmol/l sacarosa, mientras se ejercía presión con un mortero durante 5 minutos manteniendo la muestra a 4°C. El contenido proteico en cada condición se determinó por el método de BCA como se ha explicado anteriormente.

La actividad enzimática NADPH oxidasa se detectó mediante un ensayo de quimioluminiscencia por lucigenina. Este método se basa en la capacidad de la enzima NADPH oxidasa para reducir el compuesto lucigenina y cómo esta es posteriormente oxidada y excitada por los aniones O_2^- producidos también por el mismo sistema enzimático. La oxidación de la lucigenina libera fotones que pueden ser detectados por un luminómetro en las condiciones adecuadas (**Figura 14**). Así, los extractos celulares (10 μg de proteína en cada condición) se incubaron con tampón de homogenización que contenía 5 $\mu\text{mol/l}$ de N,N'-dimetil-9,9'-biacridinium dinitrato (lucigenina) y 100 $\mu\text{mol/l}$ de NADPH como sustrato de la actividad enzimática. La emisión lumínica fue medida cada 10 segundos durante 5 minutos en un sistema luminómetro (Optocomp, MGM Instruments, Hamdem, Conética, EE.UU.). La actividad enzimática se expresa como unidades lumínicas relativas (URL) por minuto, normalizado respecto al contenido proteico (en μg) en cada variable.

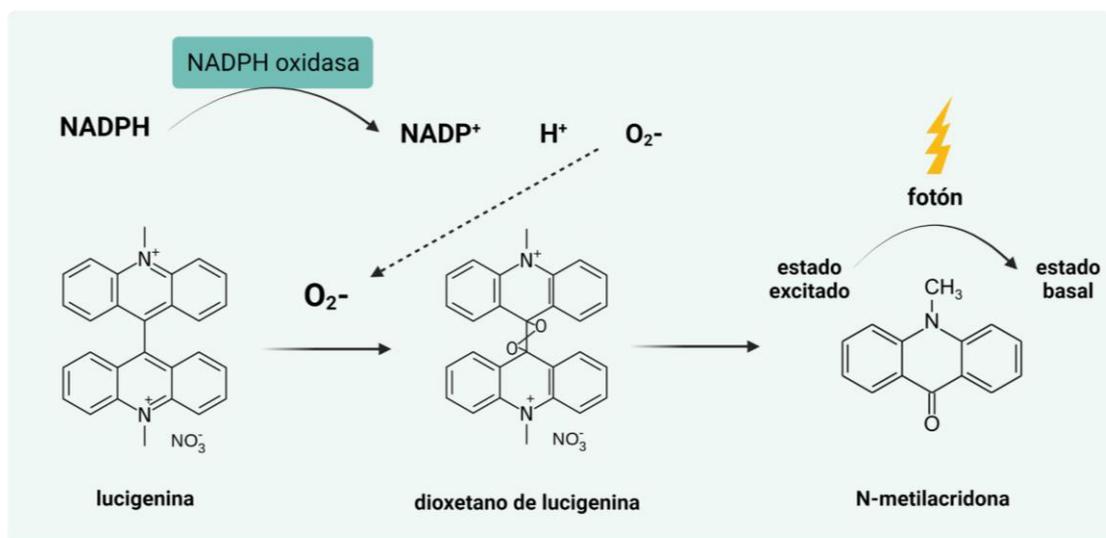


Figura 14. Esquema de las reacciones que fundamentan el método de determinación de la actividad NADPH oxidasa por quimioluminiscencia. Cada muestra mantiene intacta la enzima NADPH oxidasa, que puede funcionar al aportar a la reacción el sustrato NADPH en presencia de lucigenina. Los radicales O_2^- producidos a consecuencia de la oxidación del NADPH reaccionan con la lucigenina a través de una serie de reacciones que terminan con la formación de N-metilacridona y la liberación de un fotón que puede ser detectado en un luminómetro. Figura diseñada con Biorender.

5. Inmunofluorescencia indirecta

5.1. Detección de *foci* de γ H2AX y *foci* de disfunción telomérica (TIFs)

La histona H2AX aparece fosforilada al introducirse daños que causan roturas en la doble cadena del ADN. Por tanto, los puntos de fosforilación de H2AX o γ H2AX *foci* en el ADN representan puntos de daño en el material genético (Kuo y Yang, 2008). Por su parte, cuando el marcaje de γ H2AX colocaliza con la zona telomérica, se habla de puntos específicos de daño y disfunción de los telómeros o TIFs (*telomere dysfunction-induced foci*) (Takai et al., 2003).

Tanto los foci de γ H2AX como los TIFs inducidos por los diferentes estímulos en HUVEC, fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 600 células por cm^2 , sobre cristales tratados con colágeno tipo I en ácido acético 0,1 mol/l para su correcta adherencia. Después de los tratamientos de interés, las células se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabilizaron con 0,25 % Tritón X-100 durante otros 10 minutos. Las células se lavaron con PBS y se bloquearon durante una hora con una solución de 1% BSA en PBS y 0,1 % Tween-20. Posteriormente fueron incubadas durante una hora con los anticuerpos primarios frente al factor de unión a repeticiones teloméricas (TRF-1), anti-TRF-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anti- γ H2AX (Cell Signalling Technology), seguidos de 12 horas de incubación con los anticuerpos secundarios especie-específicos asociados a un fluoróforo fluorescente (ambos de Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE.UU., **Tabla 3**). Por su parte, los núcleos celulares se tiñeron con 1 $\mu\text{mol/l}$ 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los cristales se montaron en cubreobjetos y se analizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 801 conectado a una cámara digital Hamamatsu Orca 285. Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas con el software de análisis de imagen Volocity 3D (Pekin Elmers Inc., versión 5.5). Los valores de intensidad de fluorescencia fueron transformados a vóxels (píxeles en tres dimensiones) y posteriormente analizados como una proyección de imágenes. La intensidad de fluorescencia media de cada proteína detectada (expresada en la forma de vóxels por célula) y el porcentaje de células con presencia de TIFs, se determinaron por conteo manual de al menos 200 núcleos en 10 campos aleatorios por cada condición.

5.2. Determinación de la activación del complejo inflamasoma NLRP3: detección de *specks* de ASC

Las HUVEC se sembraron a una densidad de 600 células por cm², en placas de 24 pocillos de 16 mm de diámetro y sobre cristales tratados con colágeno tipo I en ácido acético 0,1 mol/l. Se trataron durante 24 horas con los estímulos requeridos y se procedió con el protocolo de inmunofluorescencia indirecta.

Seguidamente a su activación, la proteína NLRP3 oligomeriza e interacciona con la proteína ASC para conformar una estructura multiproteica mantenida por uniones homo y heterólogas donde la caspasa-1 será a su vez activada y procesará las formas maduras de IL-1 β e IL-18. Este entramado proteico se conoce como el *speck* de ASC (*speck*, del alemán "gotícula"), detectable de forma macroscópica, con forma toroidal característica y que aparece en la región paranuclear (Beilharz et al., 2016). La formación de *specks* de ASC se entiende, por tanto, como una señal indirecta de la activación completa del inflamasoma NLRP3 (Stutz et al., 2013).

Los *specks* de ASC fueron detectados en los cultivos de HUVEC tras la fijación con paraformaldehído 2% durante 10 minutos, bloqueo con PBS 0,1% BSA y Tritón X-100 e incubación con el anticuerpo primario frente a ASC (Enzo Life Sciences; **Tabla 3**), durante al menos 16 horas a 4°C en el interior de una cámara húmeda para evitar la evaporación. Seguidamente a tres lavados con PBS, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra frente a conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 594 (Invitrogen, **Tabla 3**). Por su parte, los núcleos celulares se tiñeron con 1 μ mol/l DAPI.

Los cristales se colocaron en un portaobjetos adherido con el medio de montaje "*prolong*". El número de *specks* de ASC se cuantificó por detección de las estructuras en 17 campos distribuidos radialmente en cada muestra, en un microscopio invertido de fluorescencia Eclipse TE300 empleando un aumento X1000. Las imágenes representativas se tomaron como proyecciones de secciones de 0,1 μ m en un microscopio confocal TCS SPE (Leica, Wetzlar, Alemania).

Tabla 3. Anticuerpos empleados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia indirecta.

Antígeno diana	Casa comercial	Especie	Dilución de trabajo
TRF-1	Abcam, clon TFR-78 (Ref: ab10579)	Ratón	1/500
γ H2AX (Ser139)	Cell Signalling Tech. (Ref: 2577S)	Conejo	1/500
ASC	Enzo Life Sciences (Ref: ADI-905-6515)	Conejo	1/200
IgG anti-ratón Alexa Fluor 488	Invitrogen (Ref: A32723)	Cabra	1/10000
IgG anti-conejo Alexa Fluor 594	Invitrogen (Ref: 32749)	Cabra	1/10000

6. Cuantificación de secreción de citoquinas por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se empleó el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para cuantificar la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-6 por las HUVEC. Para ello, se empleó un kit comercial de RayBiotech (Georgia, EE.UU.). El principio de la técnica es muy similar al de la inmunofluorescencia indirecta. En este caso, la proteína que será detectada se encuentra en el sobrenadante celular y el propio kit comercial incluye una placa que sirve como soporte para la detección de la IL-6 a través de anticuerpos. La placa lleva adherido el anticuerpo primario específico para el reconocimiento de la IL-6 en la muestra y en el protocolo se conseguirá la retención de la proteína y su detección por un anticuerpo adicional que emitirá la señal detectable por espectrofotometría. El resultado es la localización de la proteína a detectar entre dos anticuerpos específicos a modo de sándwich, como se muestra en la **Figura 15**. La señal es proporcional a la concentración (en pg/ml) de la IL-6 secretada por las HUVEC en respuesta a cada uno de los tratamientos.

El sobrenadante del cultivo de HUVEC se recogió de los mismos experimentos en las que las células fueron lisadas para la detección de proteínas por Western blot, como se ha mencionado anteriormente. En un primer paso, se descongelaron las muestras en hielo y se tomaron 100 μ l del sobrenadante en cada condición, para ser incubado en la placa de soporte del ELISA durante 2,5 horas. Por otro lado, se añadió en duplicado una curva de referencia de concentraciones conocidas de IL-6 recombinante humana (1,37 – 1000pg/ml). Tras los lavados correspondientes, se incubó la placa con el segundo de los anticuerpos durante 1 hora más. El anticuerpo superior está asociado a una molécula de biotina, que será unida a estreptavidina en los siguientes pasos del ensayo. La interacción entre biotina y

estreptavidina permite amplificar la señal de detección de la proteína de interés y aumentar la sensibilidad del ensayo. La estreptavidina es una molécula tetramérica capaz de unirse a cuatro unidades de biotina de una sola vez. Además, en el kit comercial, la estreptavidina está asociada a una molécula de HRP, que en presencia de un sustrato específico produce un color intenso y proporcional al contenido de la proteína de interés (**Figura 15**). En este caso, se añadió el sustrato 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) que resultó en la coloración azul de los pocillos tras la reacción con la HRP. Tras 12 minutos de incubación, se paró la reacción química con ácido sulfúrico 0,2 mol/l, que provocó un cambio brusco de pH y el viraje del color azul a amarillo, que pudo ser cuantificado según su absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELX800 de Bio-Tek Instruments (Winooski, Vermont, EE.UU.). La relación entre absorbancia y cantidad de IL-6 en cada condición se cuantificó por intrapolación con respecto a la curva patrón de IL-6 recombinante humana.

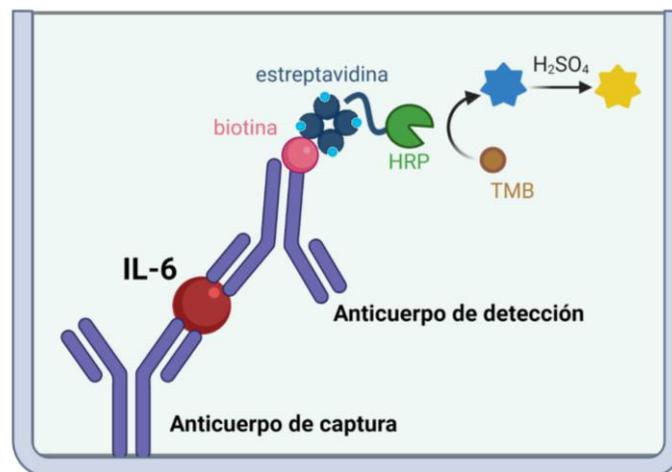


Figura 15. Técnica de detección de la secreción de IL-6 por ELISA. Se ha empleado un kit comercial que permite la captura de la IL-6 secretada en el sobrenadante del cultivo celular de HUVEC y su detección a través de un anticuerpo biotinilado que es reconocido por estreptavidina conjugada a HRP. El sustrato TMB es oxidado por la peroxidasa y adquiere una coloración azul que vira a amarillo al parar la reacción química con ácido sulfúrico. La medida de absorbancia a 450 nm puede relacionarse con la cantidad inicial de IL-6 en cada condición. Figura diseñada con Biorender.

7. Cohorte de pacientes obesos y no obesos

En la presente tesis doctoral se muestran resultados extraídos del procesamiento de muestras de sangre y epiplon (omento) de sujetos humanos. Los procedimientos de extracción y manipulación, así como el protocolo de protección de datos personales han sido aprobados y regulados por el Comité Ético del Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España) y la Universidad Autónoma de Madrid, y siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

Los pacientes participantes en el estudio (edad media 50 ± 13 años, 57% hombres) fueron clasificados atendiendo a su IMC como único criterio. Se clasificaron como obesos aquellos pacientes con $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ($n=16$) y como control o no obesos aquellos pacientes con $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ ($n=20$). Todos los pacientes fueron sometidos de forma no urgente a una cirugía abdominal laparoscópica programada, que consistió en colecistectomías y cirugía bariátrica para los pacientes control y obesos, respectivamente.

7.1. Recogida de biopsias de epiplon humano y parámetros clínicos

Tras la firma del correspondiente consentimiento informado, durante la cirugía abdominal el personal del servicio de cirugía extrajo un fragmento de aproximadamente 3 cm de epiplon del paciente, mantenido a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Las biopsias de epiplon se diseccionaron y se extrajeron las arterias mesentéricas, para el estudio de reactividad vascular, y se congeló la grasa visceral restante para la realización de experimentos de biología molecular, como se detalla más adelante. Por otro lado, los parámetros antropométricos y bioquímicos se tomaron del registro en las historias clínicas de la analítica preoperatoria.

7.2. Estudio de la expresión génica en explantes de grasa visceral por RT-qPCR

Para el estudio de la expresión diferencial de genes en los explantes de tejido adiposo visceral humano, la sección de grasa se congeló a -80°C después del aislamiento de las microarterias mesentéricas. El día del experimento, se tomó un fragmento de 30 mg de tejido adiposo del cual se extrajo el ARN total mediante el protocolo clásico de trizol-cloroformo. La sección de tejido se trasladó a un tubo de 2 ml con 1000 μl de trizol (NZYol, NZYTech, Lisboa, Portugal) y se homogenizó utilizando un homogenizador mecánico tipo Kinematica Polytron PT 10-35 GT (Thermo Fisher Scientific) a velocidad media-alta (10-15 m/s) hasta su completa disgregación. El homogenado se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm y 4°C en una

centrífuga Eppendorf 5415R, y se retiró la fracción de grasa en la capa superficial. Al resto del homogenado se añadieron 200 µl de cloroformo y se centrifugó de nuevo a 12000 rpm 15 minutos a 4°C. Se retiró la fase acuosa para la posterior precipitación del ARN con 500 µl de isopropanol. El precipitado de ARN se lavó con etanol puro estéril y posteriormente se diluyó en agua libre de ARNasas. La integridad y concentración del ARN total se estimaron a partir de la absorbancia a 260 y 280 nm medidas en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Se consideraron como muestras válidas aquellas con rangos de proporción de absorbancia 260/280 comprendidos entre 1,8-2.

La retrotranscripción (RT) del ARN a ADN complementario (ADNc) se realizó tomando 500 ng de ARN total, siguiendo las indicaciones en el kit comercial "*NZY First-Strand cDNA Synthesis kit*" (NZYTech). Para obtener el correspondiente ADNc, la reacción se sometió en un termociclador ATC 401 versión 5.3.9 (Nyx Technik, San Diego, EE.UU.) a los ciclos de temperatura diseñados por el fabricante indicados a continuación: 25°C 5 minutos, 50°C 30 minutos, 85°C 5 minutos, y se matuvo a 4°C hasta su uso o almacenaje.

A partir del ADNc obtenido por RT se empleó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para evaluar el nivel relativo de expresión de los genes de interés en la grasa visceral de cada paciente. Para ello se empleó el protocolo para qPCR SYRBR Green. Debido a que este método tiende a la inespecificidad por el procedimiento de unión a la polimerasa, se evaluó el rendimiento de la reacción y el funcionamiento de los cebadores diseñados con anterioridad al ensayo de qPCR con las muestras humanas. Una vez puesto a punto para cada pareja de cebadores, se preparó la reacción de qPCR en un volumen final de 10 µl a partir de la mezcla de reacción del kit "*iTaq Universal SYRBR Green Supermix*" (Biorad), los cebadores específicos para cada gen (Sigma) indicados en la **Tabla 4** diluidos 1:10 en agua libre de ARNasas y 3 µl de ADNc diana. La expresión relativa de cada gen se determinó por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, empleando la expresión del gen constitutivo ARNr 18S para la normalización.

Tabla 4. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica en grasa visceral humana por RT-qPCR.

Gen de interés	Cebador sentido	Cebador antisentido
DPP4	5'CTCCAGAAGACAACCTTGACCATTACA3'	5'TCATTTCATCATCTTGACAGTGCAG3'
p53	5'CCAGCCAAAGAAGAAACCAC3'	5'CCTCATTTCAGCTCTCGGAAC3'
p21	5'GTCAGTGTCTTGTACCCTTGT3'	5'CGGCGTTTGGAGTGGTAGAAA3'
p16	5'CCAACGCACCGAATAGTTACG3'	5'GCGCTGCCCATCATCATG 3'
NLRP3	5'GATCTTCGCTGCGATCAA3'	5'GGGATTCGAAACACGTGCATT3'
IL-1β	5'TGACCTGAGCAC CTTCTT3'	5'CCACTTGTGCTCCATATCC3'
IL-18	5'ATCGCTTCTCTCGCAAC3'	5'CTTCTACTGGTTCAGCAGCCATCT3'
rRNA 18S	5'GGAAGGGCACCACCAGGAGT3'	5'TGCAGCCCCGGACATCTAA3'

7.3. Aislamiento de arterias mesentéricas humanas y reactividad vascular

Las microarterias fueron limpiadas de grasa y tejido conectivo bajo una lupa binocular (Wild Heerbrugg Gais, Suiza) y una fuente de luz fría (Leica KL500, Solms, Alemania) en una solución fisiológica Krebs-Henseleit (KH, compuesta por 115 mmol/l NaCl, 4,6 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 1,2mmol/l MgSO₄·7H₂O, 25 mmol/l NaHCO₃, 0,01 mmol/l EDTA Na₂·2H₂O y 11,1 mmol/l glucosa) a 4°C y burbujeada continuamente con una mezcla de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).

Posteriormente, los microvasos mesentéricos fueron montados en secciones cilíndricas en un miógrafo de alambres para pequeños vasos (Modelo 610M, DMT, Dinamarca). En este sistema, las arterias son atravesadas intraluminalmente por dos alambres de tungsteno de 25 μm de diámetro. Uno de los alambres se mantiene inmóvil, mientras que el otro está conectado a un transductor que detecta los cambios de tensión producidos en el segmento arterial y que son registrados por el programa de adquisición de datos Acknowledge 3.9.2-ACQ100M (Biopac systems INc., Goleta, EE.UU.). Las arterias se mantuvieron en el tampón KH en condiciones fisiológicas de temperatura y pH (37°C, pH 7.4 y burbujeo continuo de carbógeno). La tensión basal óptima y el diámetro interno de cada segmento fue determinado con el software MyoNorm-4 (Cibertec, Madrid, España).

Para evaluar la relajación vascular, se expusieron inicialmente los segmentos arteriales a una solución despolarizante con 125 mmol/l KCl en KH para comprobar la viabilidad del segmento. Seguidamente, se lavaron las cámaras cuatro veces con KH y se dejaron reposar

30 minutos hasta que la tensión aparecía estable. Después, las arterias fueron contraídas con 35 mmol/l KCl y posteriormente se determinó su capacidad de relajación dependiente e independiente de endotelio por la adición de concentraciones acumulativas de bradiquinina (BK, 0,01 nmol/l – 10 μ mol/l) o nitroprusiato sódico (SNP, 1 nmol/l – 100 μ mol/l), respectivamente (**Figura 16**).

Se obtuvieron ocho segmentos arteriales de cada muestra de epiplon, manteniendo al menos dos como control interno no tratado. En algunos de los experimentos, las arterias además se trataron en el baño de órganos directamente con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en combinación con los fármacos e inhibidores de interés, como linagliptina (10 nmol/l), GB83 (10 μ mol/l), SQ 29,548 (10 μ mol/l), MCC950 (1 μ mol/l) o anakinra (1 μ g/ml), previamente a la curva de relajación con BK (**Figura 16**).

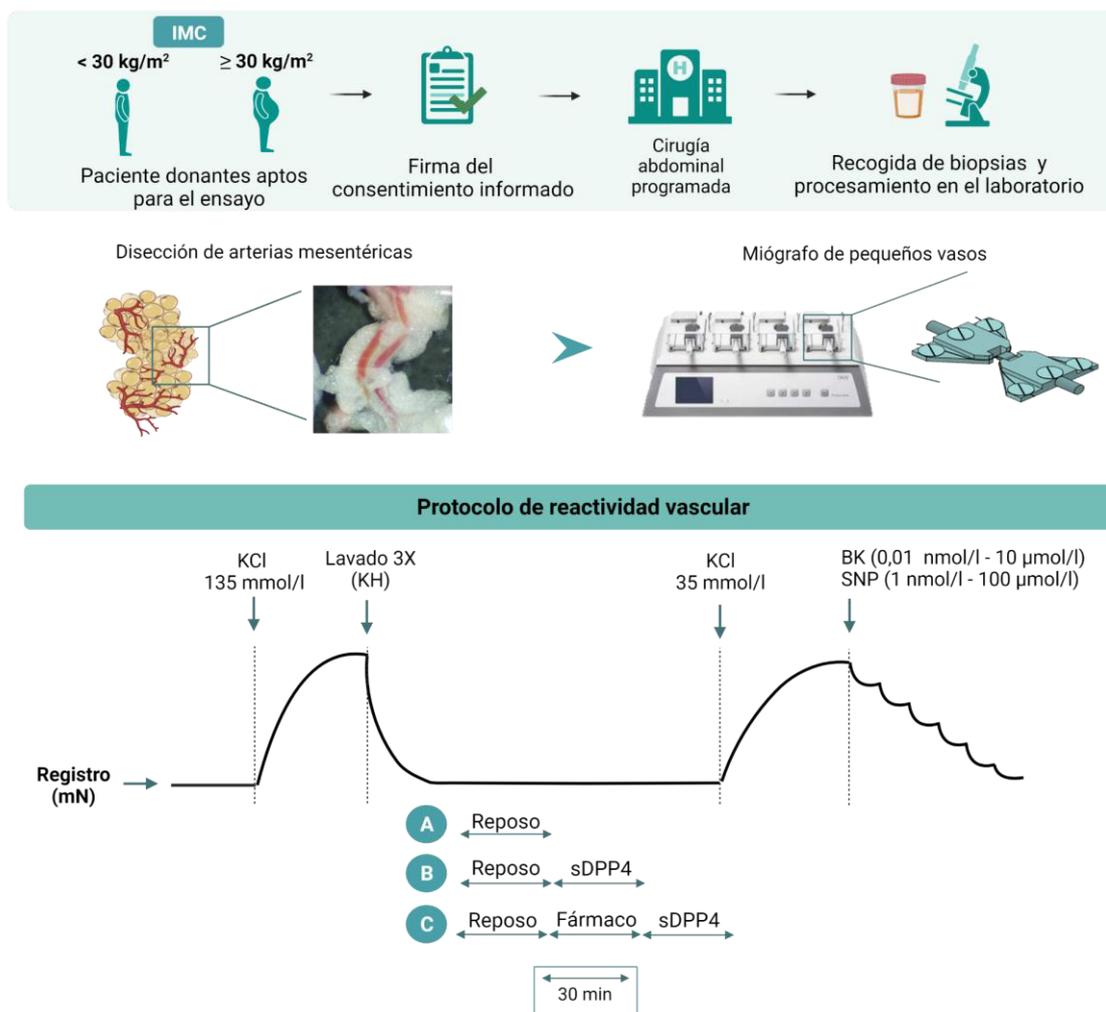


Figura 16. Esquema del protocolo de recogida y aislamiento de arterias mesentéricas humanas desde biopsias de epiplon. El protocolo de reactividad vascular registrado en miógrafo se muestra en la parte inferior. La viabilidad de los vasos se evaluó precontrayendo con KCl 135 mmol/l. Después de tres lavados con tampón KH, las arterias **(A)** se dejaron reposar 30 minutos, **(B)** se dejaron reposar y se incubaron durante 30 minutos con sDPP4 o **(C)** se dejaron reposar, se trataron con los antagonistas o inhibidores de interés previamente a la estimulación con sDPP4. Seguidamente se contrajeron con KCl 35 mmol/l y al alcanzar un nivel estable se expusieron a concentraciones crecientes de BK o SNP hasta que alcanzaron su nivel máximo de relajación. Figura diseñada con Biorender.

8. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media aritmética de las correspondientes réplicas experimentales indicadas, acompañada del error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 8.0.2 (California, EE.UU.). Para cada una de las variables analizadas se comprobó las propiedades de distribución normal y homocedasticidad mediante el test Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe, respectivamente. Para determinar las posibles diferencias entre dos grupos se aplicó el test t de Student no pareado (variables paramétricas) o el test de Mann-Whitney (variables no paramétricas). Para la determinación de diferencias entre más de dos grupos se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test post-hoc de Bonferroni en el caso de las variables paramétricas, o el análisis Kruskal-Wallis seguido del análisis posthoc de Dunn en las variables no paramétricas. El análisis de la varianza de dos vías se utilizó para evaluar la diferencia entre dos variables continuas. Finalmente, las correlaciones entre variables se determinaron mediante el cálculo del coeficiente de Spearman. En todos los casos un p-valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

PARTE I

CARACTERIZACIÓN *in vitro* DEL MECANISMO PRO-SENESCENTE INDUCIDO POR sDPP4

1. La adipocina sDPP4 induce senescencia en el cultivo de células endoteliales humanas

1.1. sDPP4 aumenta la actividad SA- β -gal e induce la parada del ciclo celular

Estudios previos en el laboratorio se habían centrado en determinar el efecto proinflamatorio de sDPP4 *in vitro*. Se había observado que sDPP4 estimula de forma concentración-dependiente tanto la proliferación como la inflamación de células de músculo liso vascular humano (CMLVH) (Wronkowitz et al., 2014), así como la producción de prostaglandinas en células endoteliales de arteria coronaria humana (Romacho et al., 2016). En este trabajo, para evaluar el efecto de sDPP4 sobre el cultivo de HUVEC, se utilizaron concentraciones crecientes de sDPP4 recombinante humana en el mismo rango que en los estudios previos (10 - 500 ng/ml).

En primer lugar, se estudió la capacidad pro-senescente de sDPP4 analizando la tinción de SA- β -gal en el cultivo celular. Las HUVEC se sometieron al tratamiento con concentraciones crecientes de sDPP4 (10-500 ng/ml) durante 18 horas. En estas condiciones, sDPP4 aumentó de forma concentración-dependiente el porcentaje de células SA- β -gal positivas (**Figura 17A y 17B**), que además presentaban las características morfológicas clásicamente asociadas a la senescencia celular, como son la forma elongada y el núcleo polimórfico (**Figura 17A**). El efecto submáximo se alcanzó con el tratamiento de 200 ng/ml sDPP4, con la cuantificación de $8,54 \pm 0,12\%$ de células senescentes respecto al $4,39 \pm 0,29\%$ de células con tinción positiva en la condición basal. Esta fue la concentración escogida para la realización de los siguientes experimentos en la tesis doctoral. Cabe destacar que los niveles circulantes de sDPP4 en sujetos sanos se encuentra en el rango entre 200-600 ng/ml (Lamers et al., 2011).

Siguiendo el transcurso de la respuesta senescente, también se observó que sDPP4 indujo un aumento en la expresión de marcadores proteicos asociados con el daño en el ADN, como la histona fosforilada γ H2AX (**Figura 18A**), y los efectores de la parada del ciclo celular como el supresor de tumores p53 (**Figura 18B**) y el inhibidor de CDK p21 (**Figura 18C**).

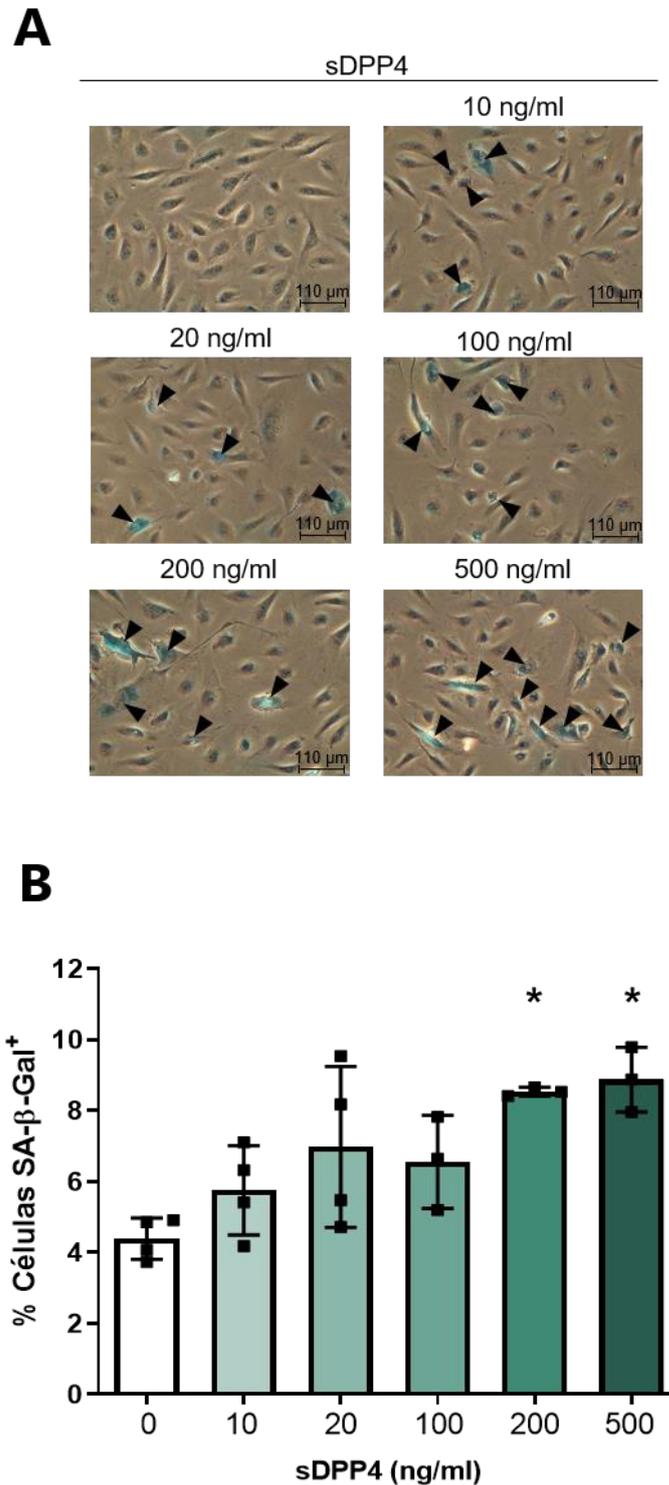


Figura 17. sDPP4 aumenta la proporción de células SA-β-gal⁺ en el cultivo de HUVEC. Las HUVEC se expusieron a concentraciones crecientes de sDPP4 (10-500 ng/ml) durante 24h y se determinó el porcentaje de células con tinción positiva para SA-β-gal. **(A)** Fotografías representativas tomadas en contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes en color azul. **(B)** Cuantificación del número de células SA-β-gal⁺ respecto al número total de células. Se cuantificaron por conteo manual de al menos 1000 células en 12 campos distribuidos aleatoriamente. Se expresan los resultados como media ± EEM de 3-4 experimentos independientes (*p<0,05 frente al % de células en el cultivo no tratado, determinado por ANOVA de una vía).

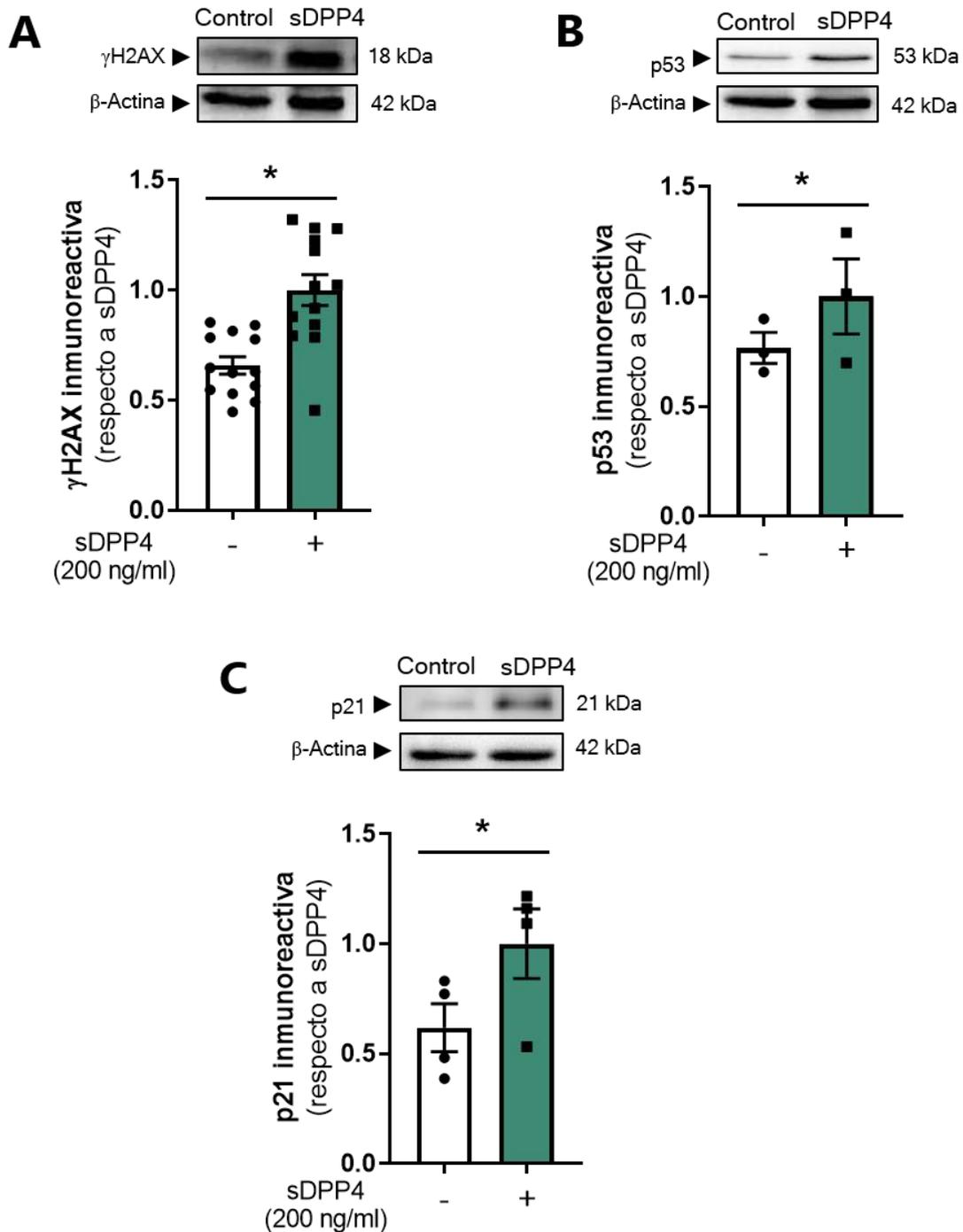


Figura 18. sDPP4 induce la expresión de mediadores pro-senescentes asociados al daño en el ADN y la parada del ciclo celular. La concentración mínima de sDPP4 que indujo un aumento significativo del porcentaje de células SA-β-gal⁺ (200 ng/ml), se empleó en los siguientes experimentos, donde las HUVEC se expusieron al tratamiento durante 18h y se estudió la expresión por Western blot de **(A)** γH2AX, **(B)** p53 y **(C)** p21. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Los resultados se expresan como media ± EEM de 3-13 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (*p<0,05 frente al control, determinado por t-test no pareado).

Resultados

1.2. sDPP4 induce daño en el ADN y disfunción telomérica

El principal desencadenante de la senescencia celular es la aparición de daños en el ADN por agotamiento telomérico o fuentes de estrés extracelular. En este trabajo, las HUVEC se trataron con sDPP4 (200 ng/ml) durante 24 horas y se analizó su capacidad para inducir daño en el ADN por doble inmunofluorescencia indirecta. Por un lado, se determinó la localización y cuantificación de los puntos de daño en el ADN o γ H2AX *foci*, complementando los resultados de la expresión proteica de γ H2AX mostrados anteriormente. Por su parte, los TIFs se consideraron como aquellos puntos de colocalización de γ H2AX *foci* y la proteína telomérica TRF-1, evidenciando la presencia de daño en los telómeros. Se detectó un aumento significativo de puntos de daño en el ADN tanto en posición no telomérica (**Figura 19A y 19B**) como telomérica (**Figura 19A y 19C**) en respuesta al tratamiento con sDPP4. Además, se observó un aumento significativo de células que acumulan más de cinco TIFs (**Figura 19A y 19D**), medida representativa de un daño cromosómico importante (Takai et al., 2003).

1.3. sDPP4 induce el fenotipo secretor senescente en el cultivo de HUVEC

Moléculas quimioatrayentes, quimioquinas y citoquinas son los componentes mayoritarios del SASP (Lopes-Paciencia et al., 2019; Coppé et al., 2010), cuya expresión está regulada en gran medida por el factor de transcripción NF- κ B (Salminen et al., 2012). Para evaluar la capacidad de sDPP4 promoviendo la activación del SASP, se analizó su efecto sobre la fosforilación de la subunidad p65 (P-p65) de NF- κ B por Western blot. El tratamiento de las HUVEC durante 18 horas con sDPP4 (200 ng/ml) indujo un aumento significativo en la expresión de P-p65 respecto al nivel de proteína no fosforilada (p65) (**Figura 20A**). Por otra parte, el estímulo con sDPP4 (200 ng/ml) desencadenó la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-6 por las HUVEC (**Figura 20B**), como se detectó mediante ELISA en el sobrenadante celular.

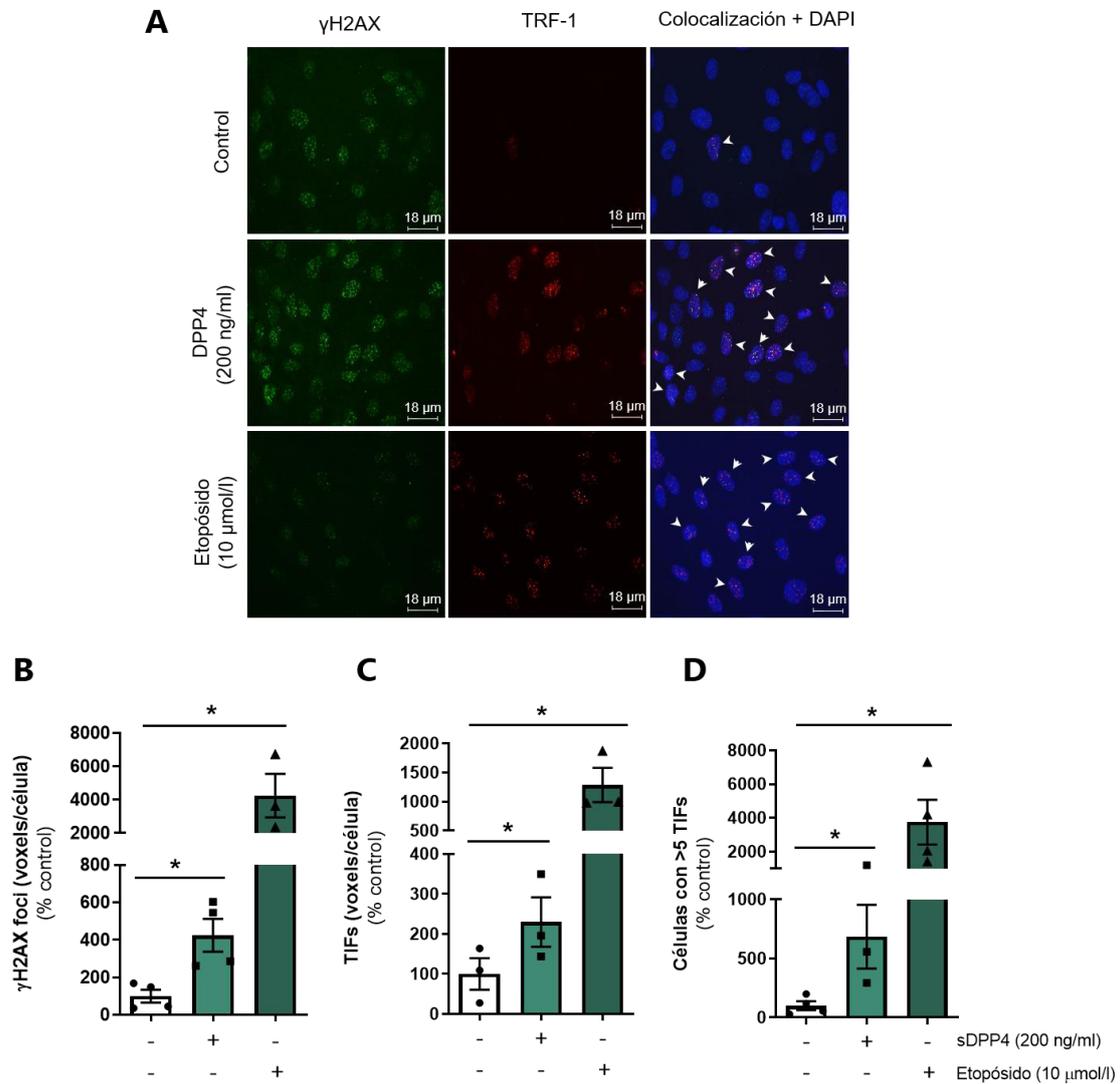


Figura 19. sDPP4 induce daño en el ADN y disfunción telomérica. Las HUVEC se expusieron durante 24h a sDPP4 (200 ng/ml) o el fármaco antineoplásico etopósido (10 μ mol/l) utilizado como control positivo, y se determinó su efecto induciendo daño en el ADN por doble inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Imágenes representativas (200X) donde se observa la tinción para γ H2AX (rojo), TRF-1 (verde) y los núcleos contrateñidos con DAPI (azul). Las flechas blancas indican los puntos de colocalización de γ H2AX y TRF-1 en color amarillo. **(B)** Los *foci* de γ H2AX y **(C)** los TIFs fueron cuantificados como la media de voxels por célula y expresados como porcentaje respecto a la fluorescencia en el cultivo no tratado. **(D)** Cuantificación de las células con ≥ 5 TIFs, expresadas respecto al porcentaje de células en el cultivo no tratado. Los datos se expresan como media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes donde se analizaron al menos 200 núcleos en cada caso (* $p < 0,05$ frente al control, determinado por ANOVA de una vía).

Resultados

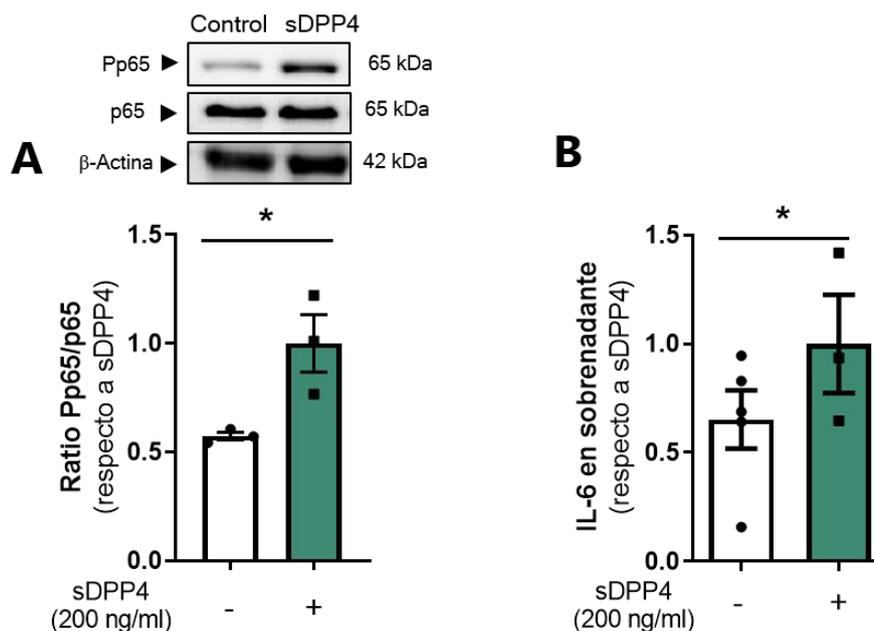


Figura 20. sDPP4 induce la activación de NF- κ B y estimula la liberación de IL-6. Las HUVEC se trataron con sDPP4 (200 ng/ml) durante 18h y **(A)** se analizó el nivel de fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B por Western blot. Se determinó el nivel de proteína fosforilada (Pp65) respecto a la proteína total (p65). Los datos se expresan como ratio Pp65/p65 respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4. En la parte superior se muestra un gel representativo del experimento. **(B)** Se determinó la secreción de IL-6 en el sobrenadante celular mediante ELISA. Se muestran los datos con respecto al nivel de producción inducido por sDPP4. Los datos se expresan como media \pm EEM de 3 experimentos independientes (* p <0,05 frente al control, determinado por t-test no pareado).

2. El eje PAR2-COX2-TP media la respuesta pro-senescente inducida por sDPP4 en HUVEC

2.1. El bloqueo del receptor PAR2 y de la enzima COX-2 previenen la senescencia inducida por sDPP4

Una vez caracterizado el papel pro-senescente de sDPP4 *in vitro*, se procedió al desglose del mecanismo molecular activado por la adipoquina en las HUVEC. Estudios previos de análisis estructural determinaron el potencial de DPP4 para activar al receptor PAR2, y la consiguiente activación de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) en CMLVH (Wronkowitz et al., 2014). Por ello, se estudió si sDPP4 podría ejercer su efecto pro-senescente mediante la activación de estos mismos mediadores en HUVEC. Previamente a la estimulación con sDPP4 (200 ng/ml), las células fueron tratadas con el antagonista de PAR2 GB83 (10 μ mol/l), el inhibidor inespecífico de COX indometacina (10 μ mol/l), o el inhibidor específico de la isoforma COX-2 celecoxib (3 μ mol/l). Por un lado, se observó que el bloqueo del receptor PAR2 y de COX prevenía significativamente el aumento en el número de células SA- β -gal positivas inducidas por sDPP4 (**Figura 21A y 21B**). Por su parte, la expresión de γ H2AX en

respuesta a sDPP4 se redujo significativamente, aunque no completamente, tras el bloqueo de PAR2 y COX-2, aunque no se detectó ningún efecto en el tratamiento con indometacina (Figura 22).

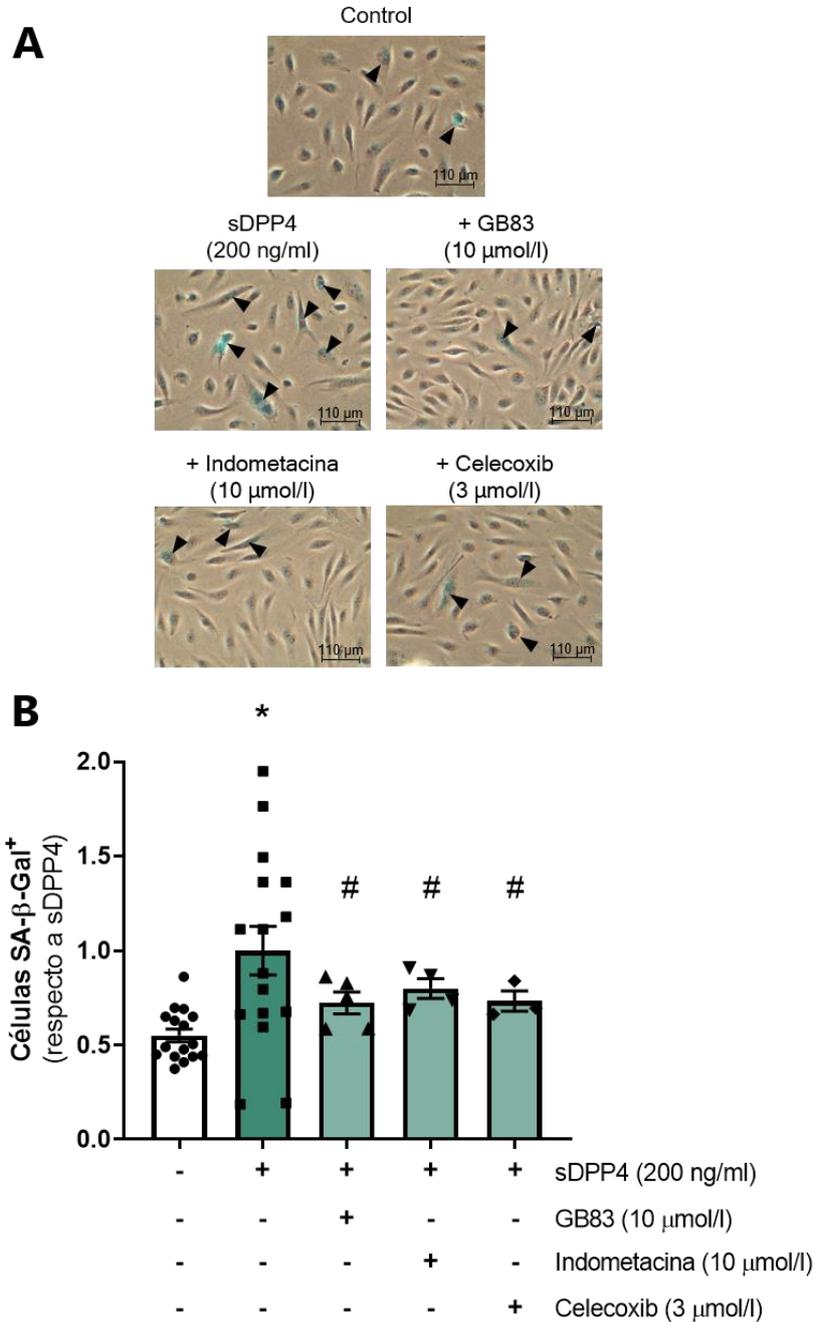


Figura 21. sDPP4 induce senescencia endotelial mediante la activación del receptor PAR2 y la actividad COX. Las HUVEC fueron estimuladas durante 24h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de GB83 (10 μmol/l), indometacina (10 μmol/l) o celecoxib (3 μmol/l), y se detectaron las células senescentes en cultivo mediante la tinción de SA-β-gal. **(A)** Fotografías representativas en modo contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes teñidas en azul. **(B)** Cuantificación del número de células SA-β-gal⁺ respecto al número total de células. Se expresan los resultados como media ± EEM de 3-5 experimentos independientes respecto a la fracción de células SA-β-gal⁺ en el cultivo tratado con sDPP4 (*p<0,05 frente al % de células en el cultivo no tratado, #p<0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía).

Resultados

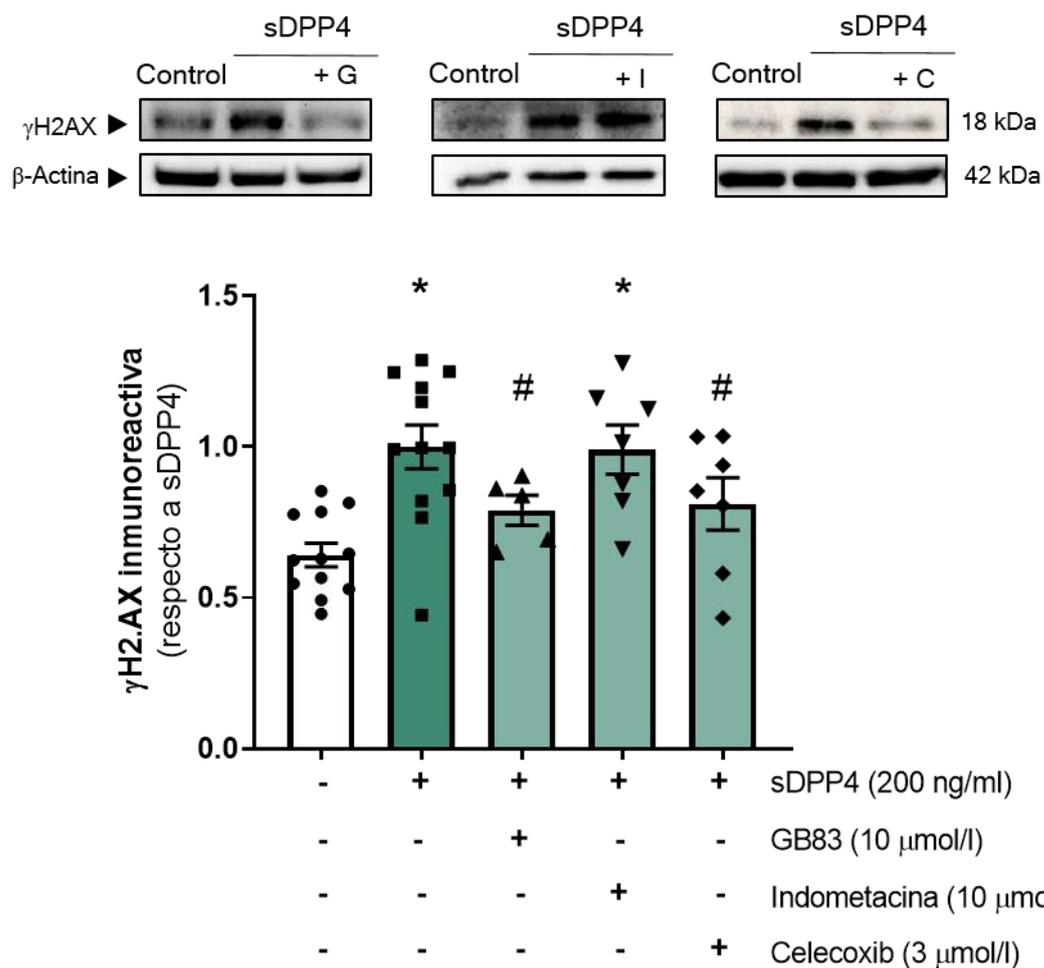


Figura 22. El daño en el ADN inducido por sDPP4 está mediado por la activación de PAR2 y COX2. Las HUVEC fueron estimuladas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de GB83 (10 μ mol/l), indometacina (10 μ mol/l) o celecoxib (3 μ mol/l) y se estudió la expresión por Western blot de γ H2AX. Los resultados se expresan como media \pm EEM de 4-7 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4. En la parte superior se muestra un gel representativo del experimento. (* $p < 0,05$ frente al control, # $p < 0,05$ frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía). G: GB83, I: indometacina, C: celecoxib.

2.2. El bloqueo de la enzima NADPH oxidasa con apocinina no previene la senescencia endotelial inducida por sDPP4

El estrés oxidativo es un mecanismo fundamental para el desarrollo del envejecimiento vascular, así como para la inducción de senescencia celular. La enzima NADPH oxidasa (NOX) se considera la principal fuente de ROS en el endotelio vascular (Incalza et al., 2017). Por esta razón, se comprobó en las HUVEC si la actividad NOX podría mediar el efecto pro-senescente de sDPP4.

Los cultivos se trataron con el inhibidor inespecífico de la actividad NOX apocinina (30 $\mu\text{mol/l}$) 30 minutos antes del tratamiento habitual con sDPP4 (200 ng/ml) durante 18 horas. Posteriormente, se estudió el número de células SA- β -gal positivas en el cultivo y la expresión del marcador pro-senescente γH2AX por Western blot. Se observó que el tratamiento con apocinina no fue capaz de prevenir la inducción de senescencia por sDPP4 en las HUVEC en ninguno de los casos (**Figura 23A y 23B**). Se estudió entonces si sDPP4 era capaz de inducir la activación de la enzima NADPH oxidasa en las HUVEC mediante un ensayo de quimioluminiscencia por lucigenina. sDPP4 (200 ng/ml) no indujo la activación de la NOX en las HUVEC (**Figura 24**), a diferencia del efecto de IL-1 β (5 ng/ml), empleado como control positivo de la inducción de NOX a nivel vascular.

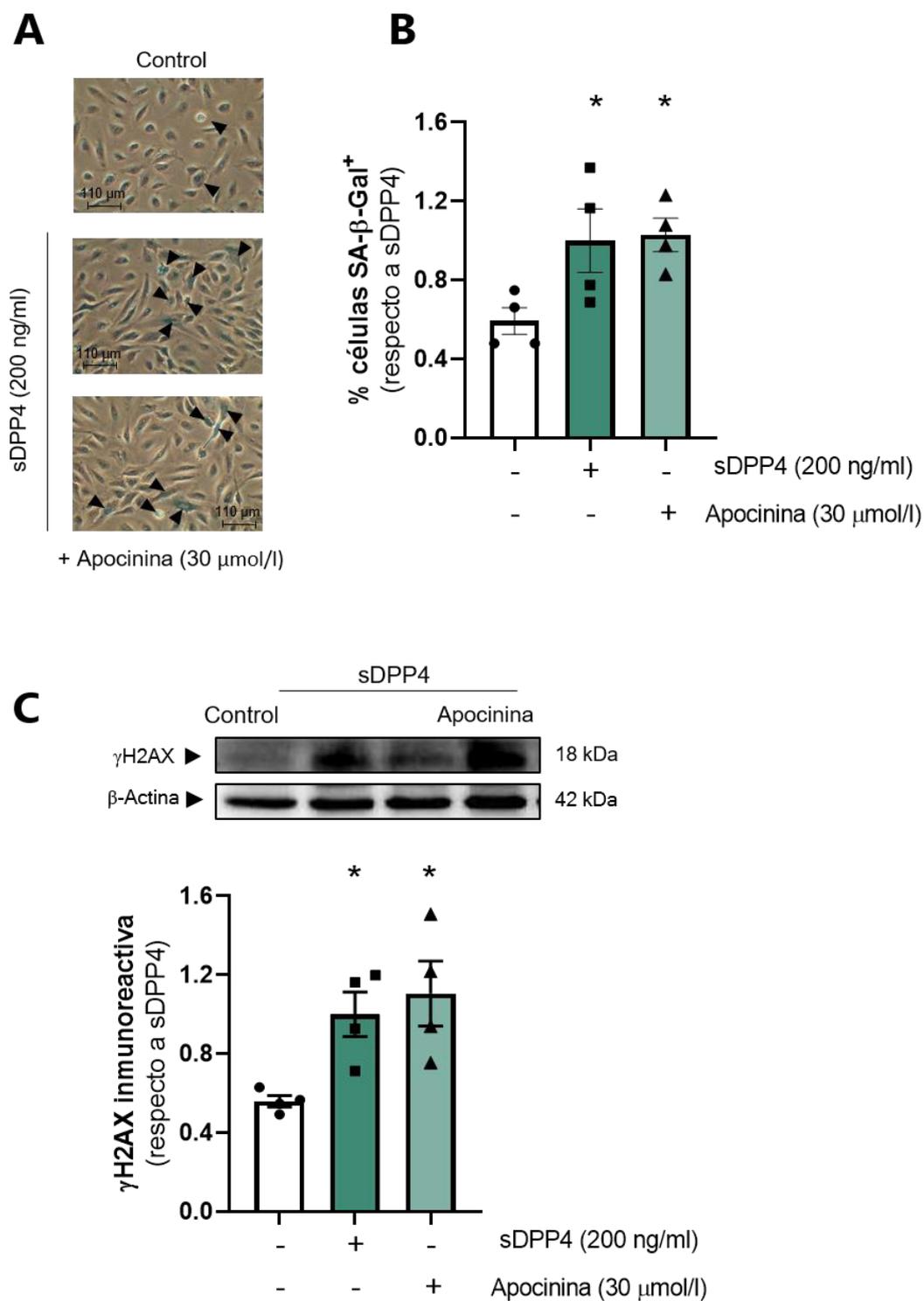


Figura 23. El efecto pro-senescente inducido por sDPP4 no requiere de la actividad NADPH oxidasa. Las HUVEC fueron estimuladas durante 24h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de apocinina (30 μmol/l). Por un lado, se detectaron las células senescentes en cultivo mediante la tinción de SA-β-gal. **(A)** Fotografías representativas en modo contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes teñidas en azul. **(B)** Cuantificación del número de células SA-β-gal⁺ respecto al número total de células. Se expresan los resultados como media ± EEM de 4 experimentos independientes respecto al % de células SA-β-gal⁺ en el cultivo tratado con sDPP4. Por otro lado, **(C)** se estudió la expresión por Western blot de γH2AX. En la parte superior se muestra un gel representativo del experimento. Se expresan los resultados como media ± EEM de 4 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (*p<0,05 frente al control determinado por ANOVA de una vía).

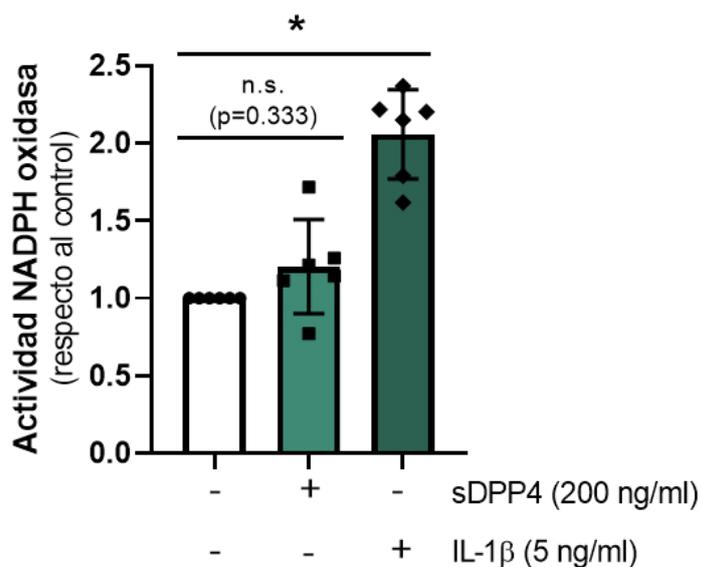


Figura 24. sDPP4 no induce la activación de la enzima NADPH oxidasa en HUVEC. Las células fueron estimuladas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) o IL-1 β (5 ng/ml), que se empleó como control positivo. Se determinó la actividad de la enzima NADPH oxidasa mediante la técnica de quimioluminiscencia por lucigenina. Las unidades de la actividad NADPH oxidasa se expresan como unidades de luz relativa (URL) emitidas por minuto y normalizado frente al contenido de proteína (en μ g) en cada condición. Se expresan los resultados como media \pm EEM de 6 experimentos independientes respecto al nivel de actividad en el cultivo no tratado. (* $p < 0,05$ frente al control, determinado por ANOVA de una vía).

2.3. La activación del receptor de tromboxano media la senescencia endotelial inducida por sDPP4

En base a los resultados obtenidos, se decidió seguir explorando el mecanismo inducido por sDPP4 a partir de la activación de la enzima COX-2, que también es una fuente importante de ROS en el endotelio. Resultados previos habían determinado que sDPP4 induce la liberación de TXA₂ en células endoteliales de arteria coronaria humana, lo que sugería la activación autocrina y paracrina del receptor de tromboxano (TP) como mediador final de su efecto en el deterioro de la relajación vascular de arterias de ratón (Romacho et al., 2016).

En primer lugar, se determinó cuál era la implicación del receptor TP en el mecanismo pro-senescente de sDPP4. Las HUVEC se trataron durante 24 horas con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en combinación con el fármaco SQ 29,548 (10 μ mol/l), antagonista selectivo del receptor TP, y se analizó la tinción de SA- β -gal y la expresión de γ H2AX mediante Western blot. Se observó que SQ 29,548 era capaz de prevenir significativamente el aumento en el porcentaje de células SA- β -gal positivas inducido por sDPP4 (**Figura 25A**). El bloqueo del receptor TP también previno significativamente la inducción de la expresión de γ H2AX por sDPP4 (**Figura 25B**).

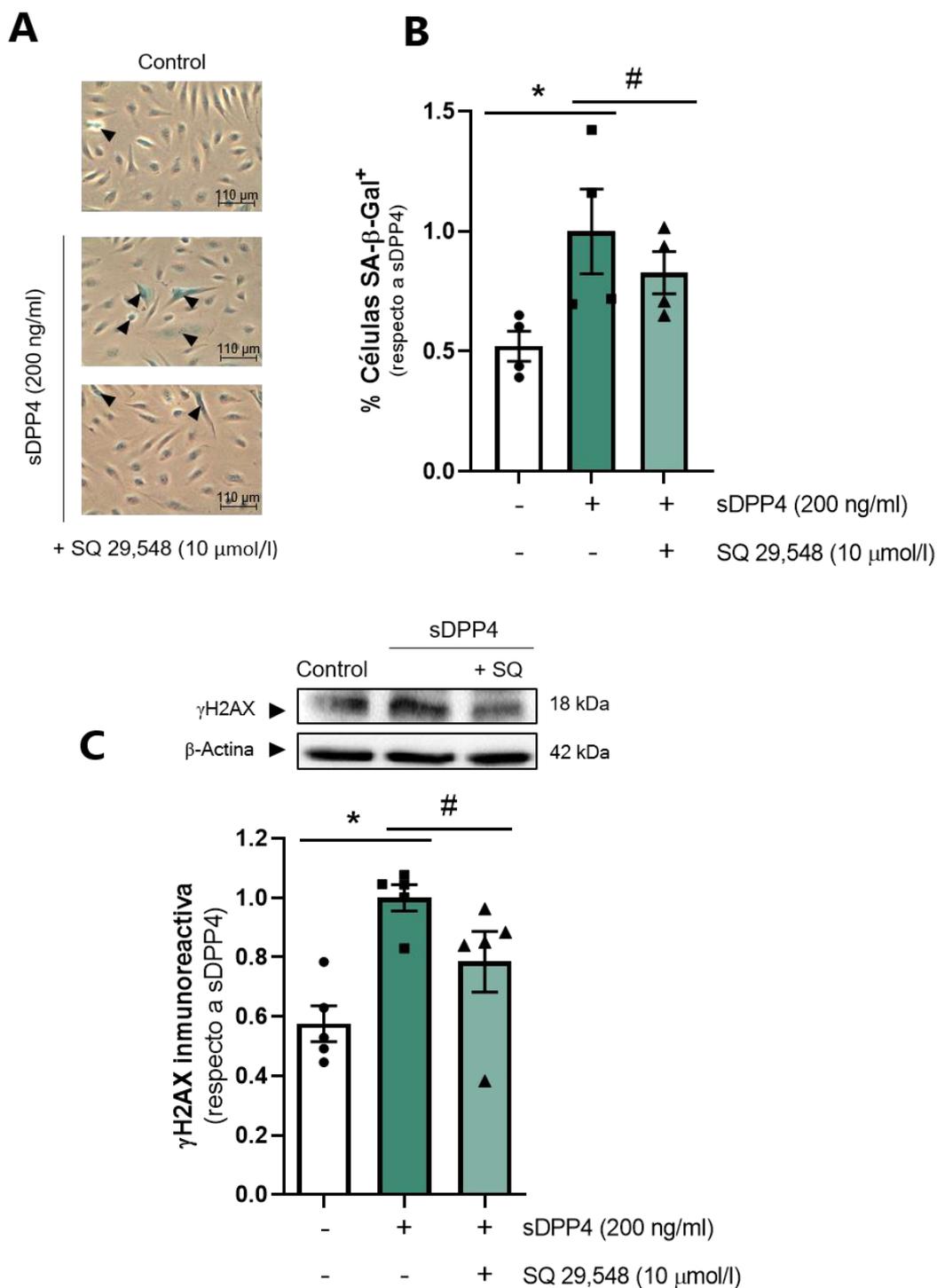


Figura 25. La activación del receptor TP media la actividad pro-senescente de sDPP4. Las HUVEC fueron estimuladas durante 24h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de SQ 29,548 (10 μmol/l). Por un lado, se detectaron las células senescentes en cultivo mediante la tinción de SA-β-gal. **(A)** Fotografías representativas en modo contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes teñidas en azul. **(B)** Cuantificación del número de células SA-β-gal⁺ respecto al número total de células. Se expresan los resultados como media ± EEM de 4 experimentos independientes respecto al % de células SA-β-gal⁺ en el cultivo tratado con sDPP4. Por otro lado, **(C)** se estudió la expresión por Western blot de γH2AX. En la parte superior se muestra un gel representativo del experimento. Se expresan los resultados como media ± EEM de 5 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (*p<0.05 frente al control, #p<0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía). SQ: SQ 29,548.

Se planteó la hipótesis de que la producción de TXA₂ mediada por la activación secuencial de PAR2-COX-2 ejerciera un efecto auto/paracrino en las HUVEC y mediara el efecto pro-senescente de sDPP4. Para analizar si TXA₂ podría actuar como mediador final en el mecanismo iniciado por la adipoquina, se comprobó si el análogo estable de TXA₂, U46619 (1 µmol/l), tenía capacidad para reproducir el efecto pro-senescente de sDPP4 en el cultivo primario de HUVEC. Las células se expusieron al tratamiento con U46619 (1 µmol/l) durante 24 horas solo o en presencia de SQ 29,548 (10 µmol/l) y se determinó el porcentaje de células senescentes en cultivo, así como la expresión del marcador γH2AX. Se observó que U46619 (1 µmol/l) aumentaba significativamente el número de células SA-β-gal positivas en el cultivo de manera análoga al efecto de sDPP4 (200 ng/ml), alcanzando el nivel de 8,71±0,53% células SA-β-gal positivas (**Figura 26A**). Igualmente, U46619 indujo la expresión de γH2AX (**Figura 26B**), y en ambos casos su efecto estuvo mediado por el receptor TP.

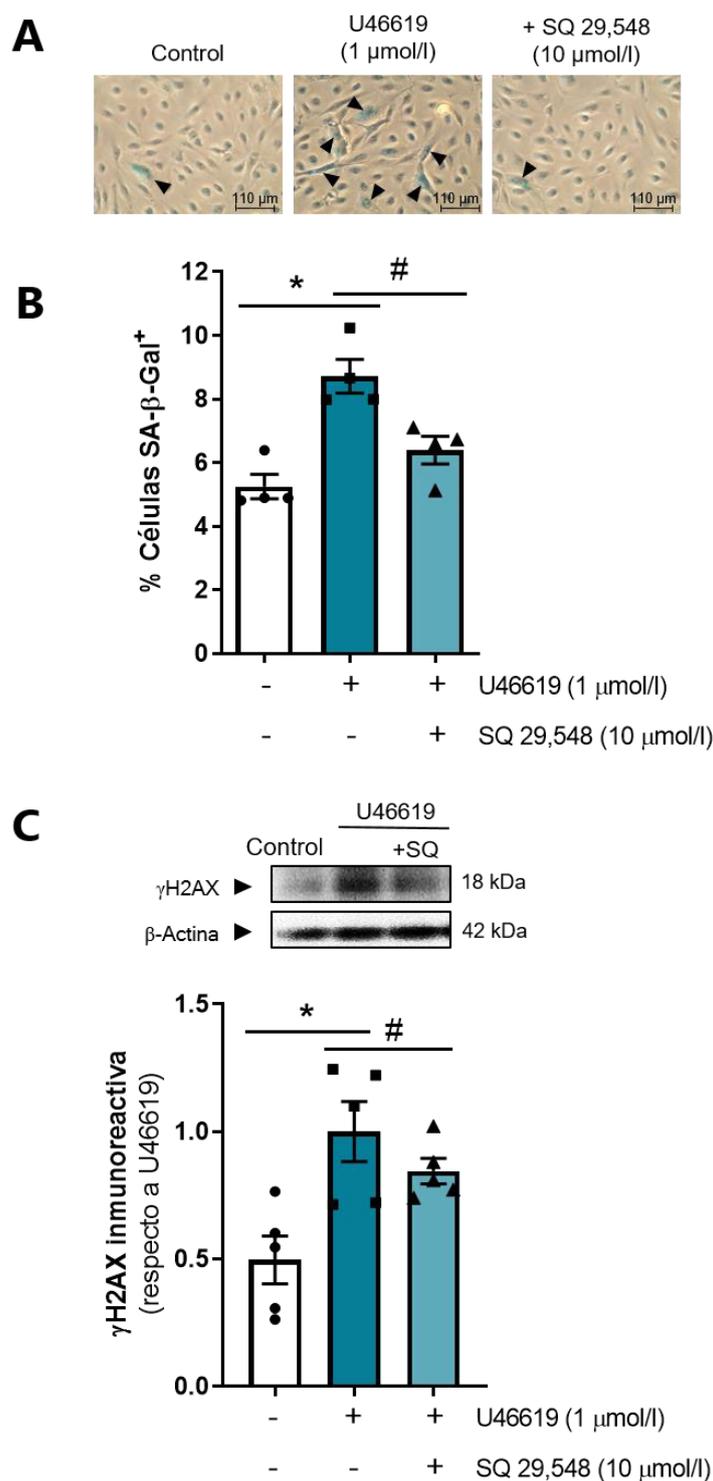


Figura 26. TXA₂ induce senescencia y daño en el ADN a través de TP en el cultivo de HUVEC. Las células fueron estimuladas durante 24h con el análogo estable de TXA₂ U46619 (1 $\mu\text{mol/l}$) solo o en presencia de SQ 29,548 (10 $\mu\text{mol/l}$). Por un lado, se detectaron las células senescentes en cultivo mediante la tinción de SA- β -gal. **(A)** Fotografías representativas en modo contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes teñidas en azul. **(B)** Cuantificación del número de células SA- β -gal⁺ respecto al número total de células. Se expresan los resultados como media \pm EEM de 4 experimentos independientes. Por otro lado, **(C)** se estudió la expresión por Western blot de γ H2AX. En la parte superior se muestra un gel representativo del experimento. Se expresan los resultados como media \pm EEM de 4 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por U46619 (* $p < 0,05$ frente al control, # $p < 0,05$ frente a U46619 (1 $\mu\text{mol/l}$), determinado por ANOVA de una vía). SQ: SQ 29,548.

3. El inflamasoma NLRP3 está implicado en la senescencia endotelial inducida por sDPP4

3.1. sDPP4 induce el cebado y la activación del inflamasoma NLRP3

La activación exacerbada del complejo inflamasoma NLRP3 está relacionada con la inflamación crónica de bajo grado y el *inflammaging* asociado a las enfermedades vasculares (Rheinheimer et al., 2017; Haneklaus y O'Neill, 2015; De Nardo, 2011). Por esta razón se estudió la posible implicación de la maquinaria del inflamasoma NLRP3 en el efecto que ejerce sDPP4 sobre el endotelio.

Como se ha desarrollado en el apartado de introducción, la activación del inflamasoma NLRP3 ocurre en dos fases. En la fase de cebado ocurre un incremento de la expresión de los componentes del complejo multiproteico, mientras que en la fase de activación estos componentes se ensamblan, se produce la activación de la caspasa-1 y el consecutivo procesamiento y liberación de los productos finales IL-1 β e IL-18 (Wang, L. y Hauenstein, 2020). Las HUVEC se expusieron a sDPP4 (200 ng/ml) y se estudió el nivel de expresión de los componentes del inflamasoma, así como la formación del complejo ensamblado o *speck* de ASC por Western blot e inmunofluorescencia indirecta, respectivamente. Por un lado, sDPP4 (200 ng/ml) aumentó los niveles de expresión de NLRP3, ASC y pro-IL-1 β (**Figura 27**). Además, sDPP4 aumentó el porcentaje de células con *specks* de ASC hasta duplicar el nivel basal, desde $2,65 \pm 0,46\%$ de células con *specks* en el cultivo no tratado a un $5,38 \pm 0,71\%$ tras el tratamiento con sDPP4 (**Figura 28A y 28B**). Además, se comprobó que el efecto inducido por sDPP4 estaba efectivamente mediado por el inflamasoma NLRP3, ya que el inhibidor específico del ensamblaje del complejo, MCC950 (1 $\mu\text{mol/l}$), fue capaz de prevenir completamente el efecto de sDPP4 (**Figura 28A y 28B**). Por último, sDPP4 aumentó la expresión de la forma activa de caspasa-1 (**Figura 29A**) y de IL-1 β madura como producto final de la activación del inflamasoma NLRP3 (**Figura 29B**).

Resultados

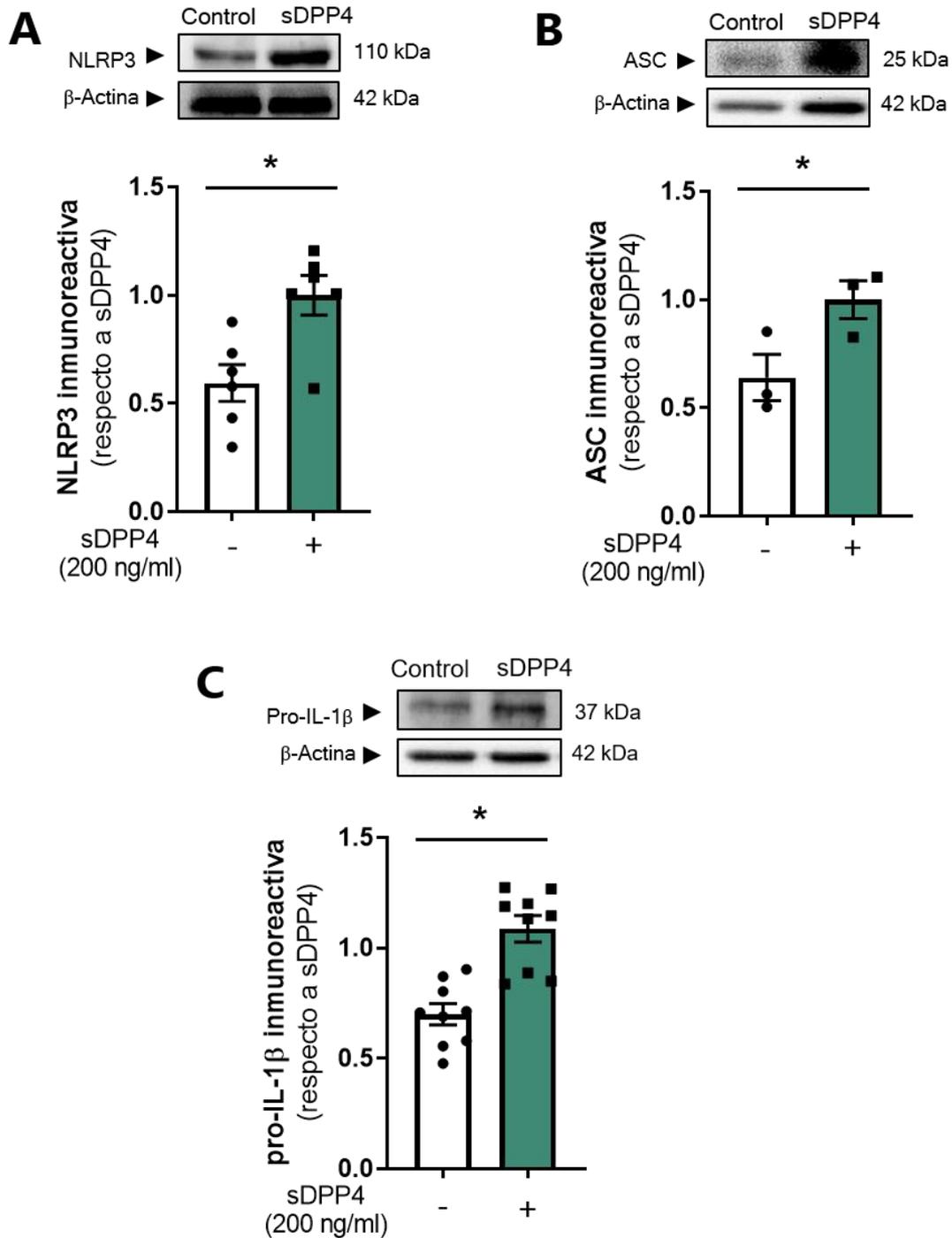


Figura 27. sDPP4 induce la fase de cebado del inflammasoma NLRP3. Las HUVEC fueron tratadas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) y posteriormente se determinó por Western blot la expresión de los componentes del complejo inflammasoma **(A)** NLRP3, **(B)** ASC y **(C)** pro-IL-1β. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Los resultados se expresan como media \pm EEM de 3-9 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (* $p < 0,05$ frente al control, determinado por t-test no pareado).

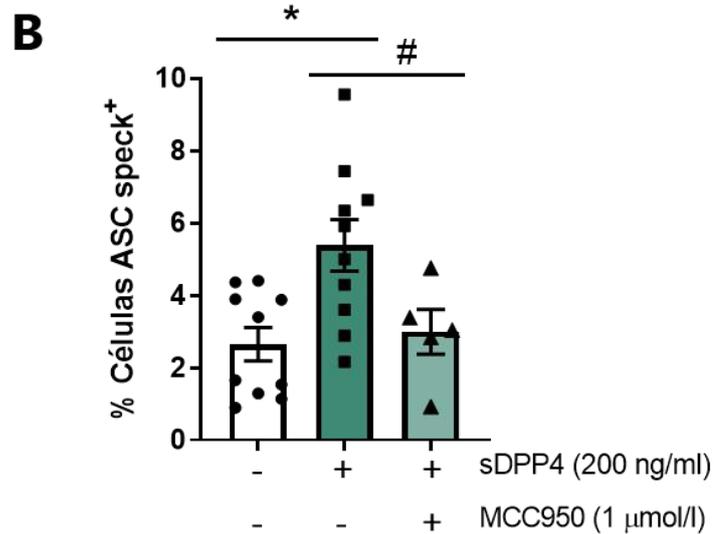
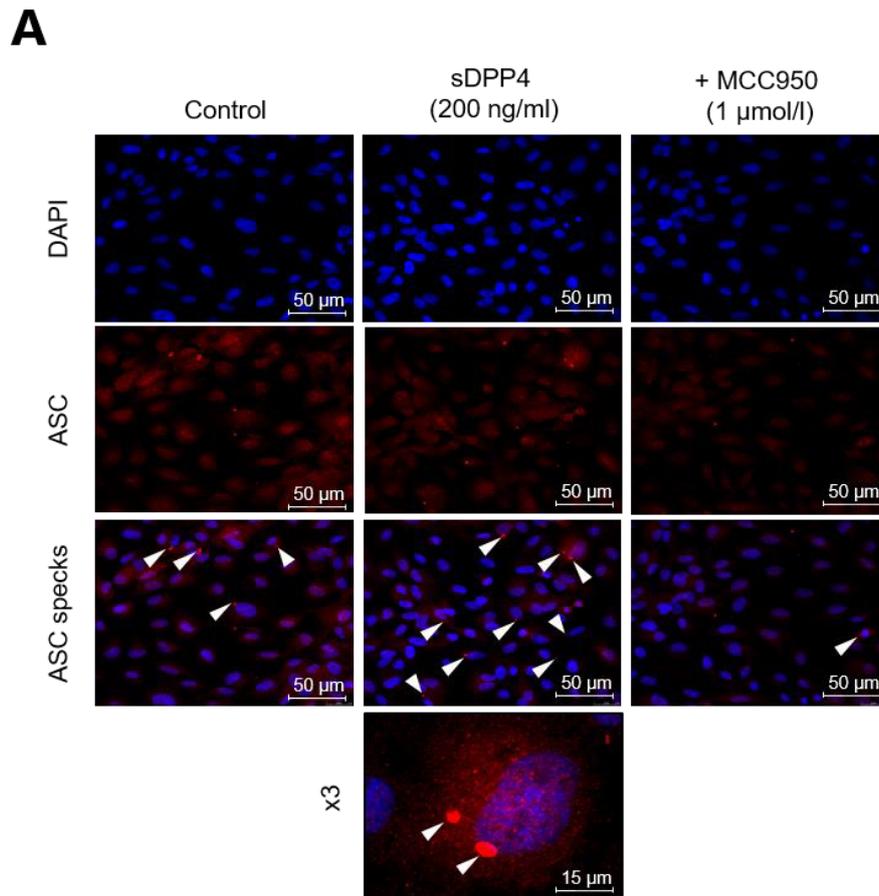


Figura 28. sDPP4 induce la oligomerización del complejo inflammasoma con la formación de specks de ASC. (A) Proyección de las imágenes tomadas en microscopía confocal (630X) tras la detección mediante inmunofluorescencia indirecta los *specks* de ASC (rojo) sobre los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (azul) en respuesta a sDPP4 (200 ng/ml) solo o en combinación con MCC950 (1 μ mol/l). **(B)** El porcentaje de células con *specks* de ASC se cuantificó con respecto al número total de células en 17 campos aleatorios del cultivo. Los datos se expresan como media \pm EEM de 5-8 experimentos independientes (*p < 0,05 frente al % de células con *specks* en el cultivo no tratado, #p < 0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía).

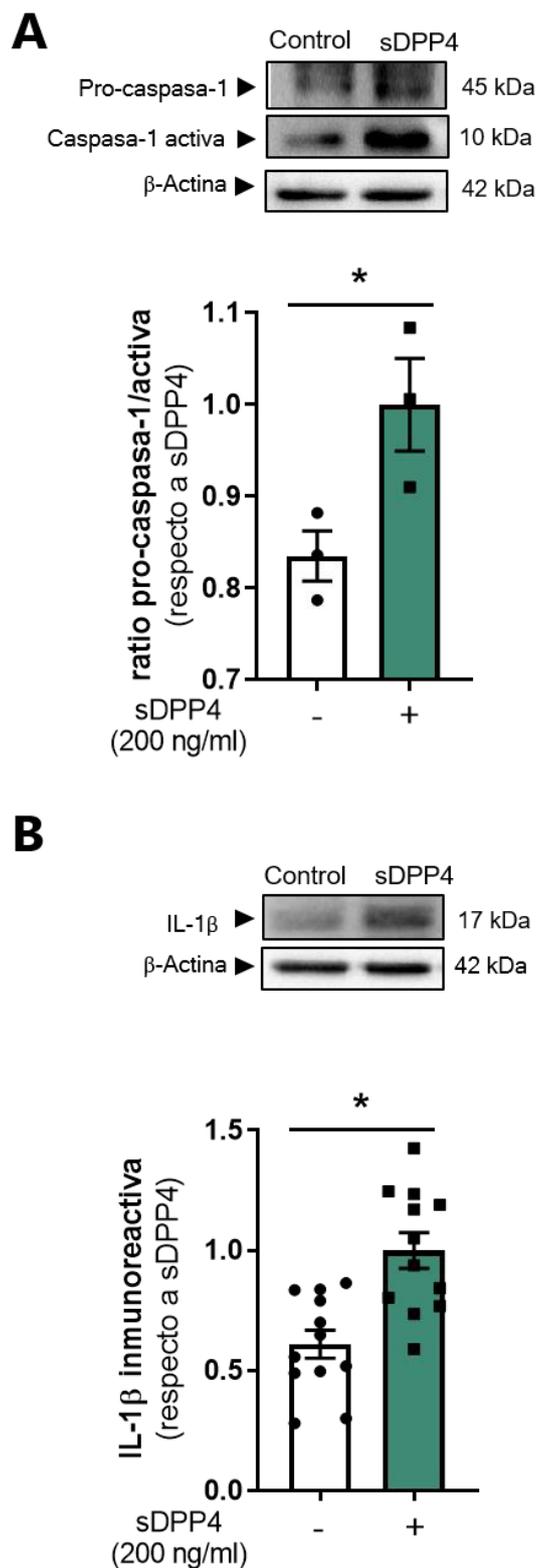


Figura 29. sDPP4 induce la fase de activación del inflamasoma NLRP3. Las HUVEC fueron tratadas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) y posteriormente se determinó la activación del inflamasoma NLRP3 mediante la detección por Western blot de la expresión de **(A)** la activación de la caspasa-1, representado como la fracción de la pro-caspasa (p45) frente a la caspasa-1 activa (p10), y de **(B)** IL-1 β madura. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Los resultados se expresan como media \pm EEM de 3-12 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (* $p < 0,05$ frente al control, determinado por t-test no pareado).

3.2. El inflamasoma NLRP3 está implicado en la senescencia endotelial inducida por sDPP4

NLRP3 es un receptor citosólico que integra señales extracelulares. Puesto que se ha demostrado anteriormente en HUVEC que sDPP4 activa el receptor de superficie PAR2 para inducir senescencia endotelial, se analizó una posible conexión entre el mecanismo de inducción de ésta mediante el eje PAR2-COX-2-TP y la activación del inflamasoma NLRP3 por sDPP4. En primer lugar, se estudió la implicación del eje PAR2-COX-2-TP en la activación del inflamasoma por sDPP4. Se observó que el bloqueo con GB83 (10 $\mu\text{mol/l}$), celecoxib (3 $\mu\text{mol/l}$), o SQ 29,548 (10 $\mu\text{mol/l}$), redujo significativamente la capacidad de sDPP4 para inducir la expresión de NLRP3 e IL-1 β madura (**Figura 30A y 30B**), así como la formación de *specks* de ASC en las HUVEC (**Figura 31**). A continuación, se comprobó si TXA₂, como efector final del eje PAR2-COX-2-TP, era capaz de inducir la activación del complejo inflamasoma por sí mismo. En efecto, el compuesto U46619 (1 $\mu\text{mol/l}$), que activa el receptor TP, indujo significativamente la expresión de NLRP3 (**Figura 32A**), así como la formación de *specks* de ASC en las HUVEC (**Figura 32B y 32C**), determinados por Western blot e inmunofluorescencia indirecta, respectivamente.

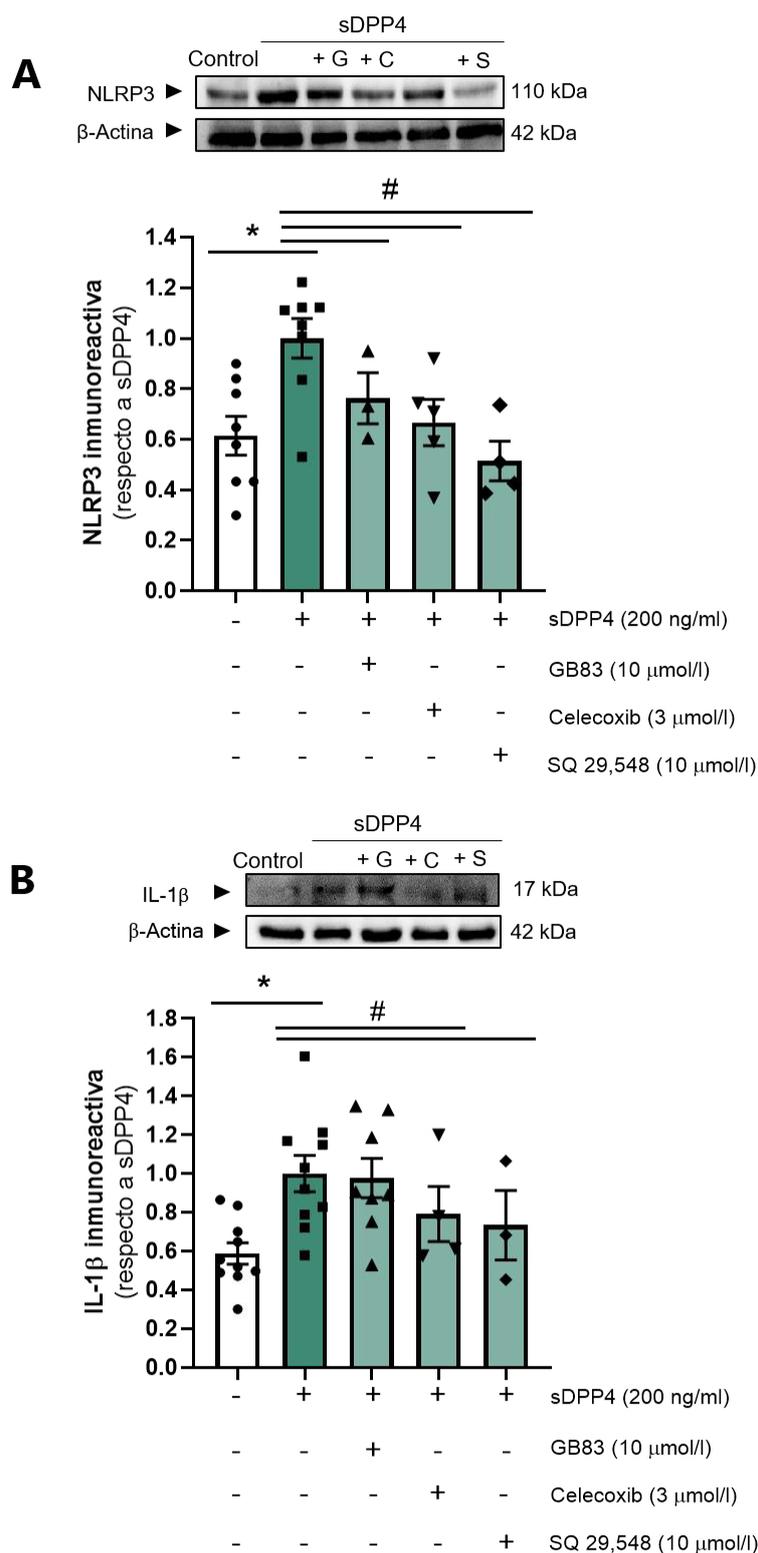


Figura 30. sDPP4 induce la activación del inflammasoma NLRP3 a través del eje PAR2-COX-2-TP. Las HUVEC fueron estimuladas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de GB83 (10 μmol/l), celecoxib (3 μmol/l) o SQ 29,548 (10 μmol/l), y posteriormente se determinó por Western blot la expresión de **(A)** NLRP3, y de **(B)** IL-1β madura, producto del complejo inflammasoma. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Los resultados se expresan como media ± EEM de 3-9 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (*p<0,05 frente control, #p<0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía). G: GB83, C: celecoxib, S: SQ 29,548.

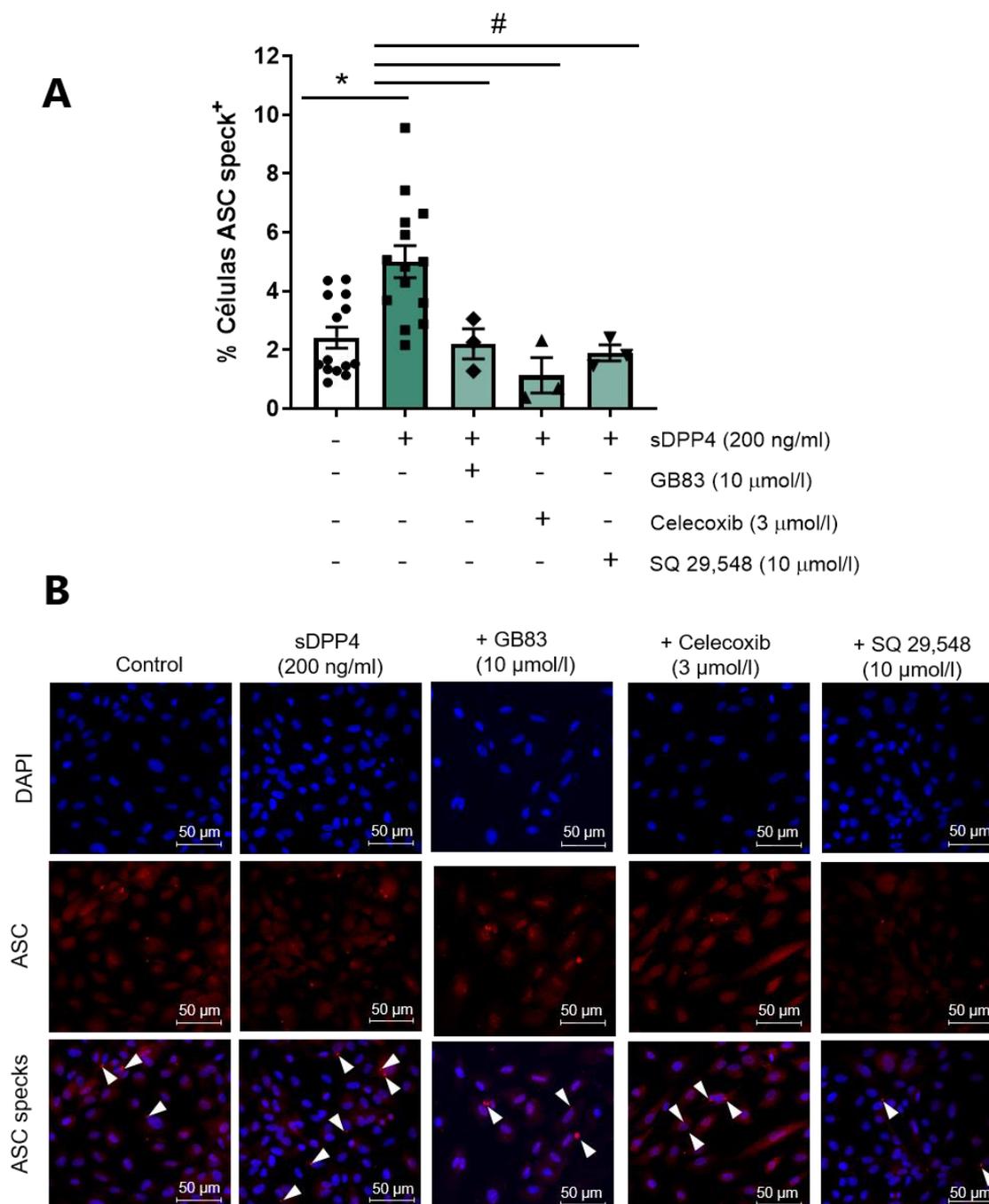


Figura 31. sDPP4 induce el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 mediante la activación del eje PAR2-COX-2-TP. Las HUVEC fueron estimuladas durante 24h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de GB83 (10 μmol/l), celecoxib (3 μmol/l) o SQ 29,548 (10 μmol/l), y se evaluó la activación del inflammasoma NLRP3 mediante la detección de *specks* de ASC por inmunofluorescencia indirecta. **(A)** El porcentaje de células con *specks* de ASC se cuantificó con respecto al número total de células en 17 campos aleatorios del cultivo. Los datos se expresan como media \pm EEM de 3-9 experimentos independientes. **(B)** Proyección de las imágenes tomadas en microscopía confocal (630X) tras la detección de los *specks* de ASC (rojo) sobre los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (azul) en respuesta a los tratamientos indicados (* $p < 0,05$ frente al % de células con *specks* en el cultivo no tratado, # $p < 0,05$ frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía).

Resultados

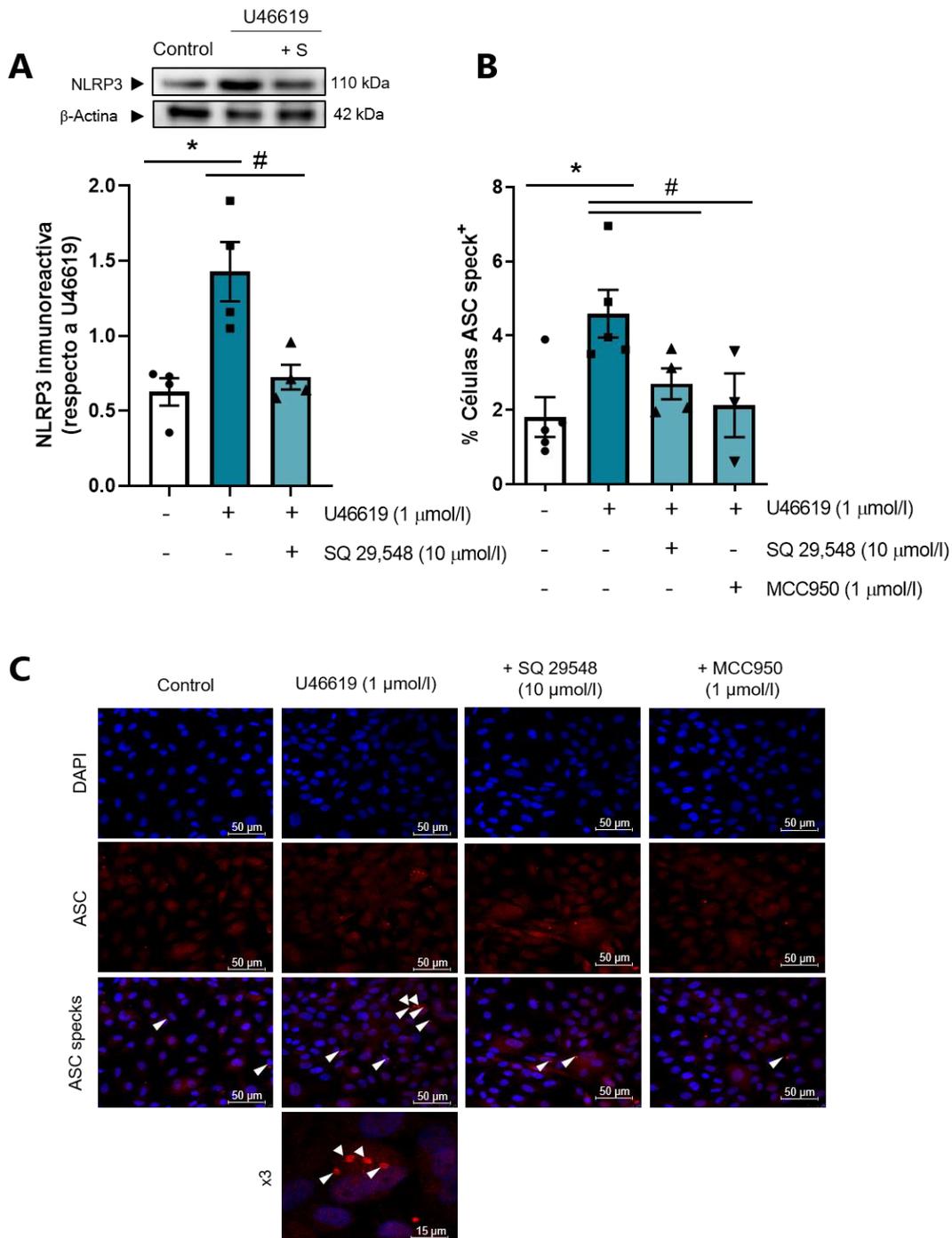


Figura 32. TXA₂ induce la fase de cebado y de activación del inflammasoma NLRP3 de forma TP-dependiente en el cultivo de HUVEC. Las células fueron estimuladas durante 18h con U46619 (1 μmol/l), solo o en presencia de SQ 29,548 (10 μmol/l). Para evaluar el progreso de la fase de cebado del inflammasoma, **(A)** se determinó la expresión de NLRP3 mediante Western blot. En la parte superior se muestra un gel representativo del experimento. Los resultados se expresan como media ± EEM de 4 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por U46619 (*p<0,05 frente control, #p<0,05 frente a U46619 (1 μmol/l), determinado por ANOVA de una vía). Por otro lado, **(B)** se detectaron los *specks* de ASC por inmunofluorescencia indirecta. El porcentaje de células con *specks* de ASC se cuantificó con respecto al número total de células en el cultivo. Los datos se expresan como media ± EEM de 4 experimentos independientes. (*p<0,05 frente al % de células con *specks* en el cultivo no tratado, #p<0,05 frente a U46619 (1 μmol/l), determinado por ANOVA de una vía). **(C)** Proyección de las imágenes tomadas en microscopía confocal (630X) tras la detección de los *specks* de ASC (rojo) sobre los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (azul) en respuesta a los tratamientos indicados. S: SQ 29,548.

El hecho de que la activación del eje PAR2-COX-2-TP mediara tanto la activación del inflammasoma NLRP3 como la inducción de senescencia endotelial por sDPP4, sugería una relación entre ambos eventos, con una posible implicación del inflammasoma NLRP3 en el mecanismo de acción por el que sDPP4 induce senescencia endotelial. Para confirmarlo, las HUVEC se expusieron a sDPP4 (200 ng/ml) o U46619 (1 μ mol/l) solos o en combinación con el bloqueante específico del ensamblaje del inflammasoma NLRP3, MCC950 (1 μ mol/l), o el inhibidor de los receptores del producto del inflammasoma IL-1 β , anakinra (1 μ g/ml). Así, se observó que tanto MCC950 como anakinra redujeron significativamente el porcentaje de células SA- β -gal positivas (**Figura 33A y 33B**) y el aumento en la expresión de γ H2AX (**Figura 34A**) y p21 (**Figura 34B**) inducidos por ambos estímulos.

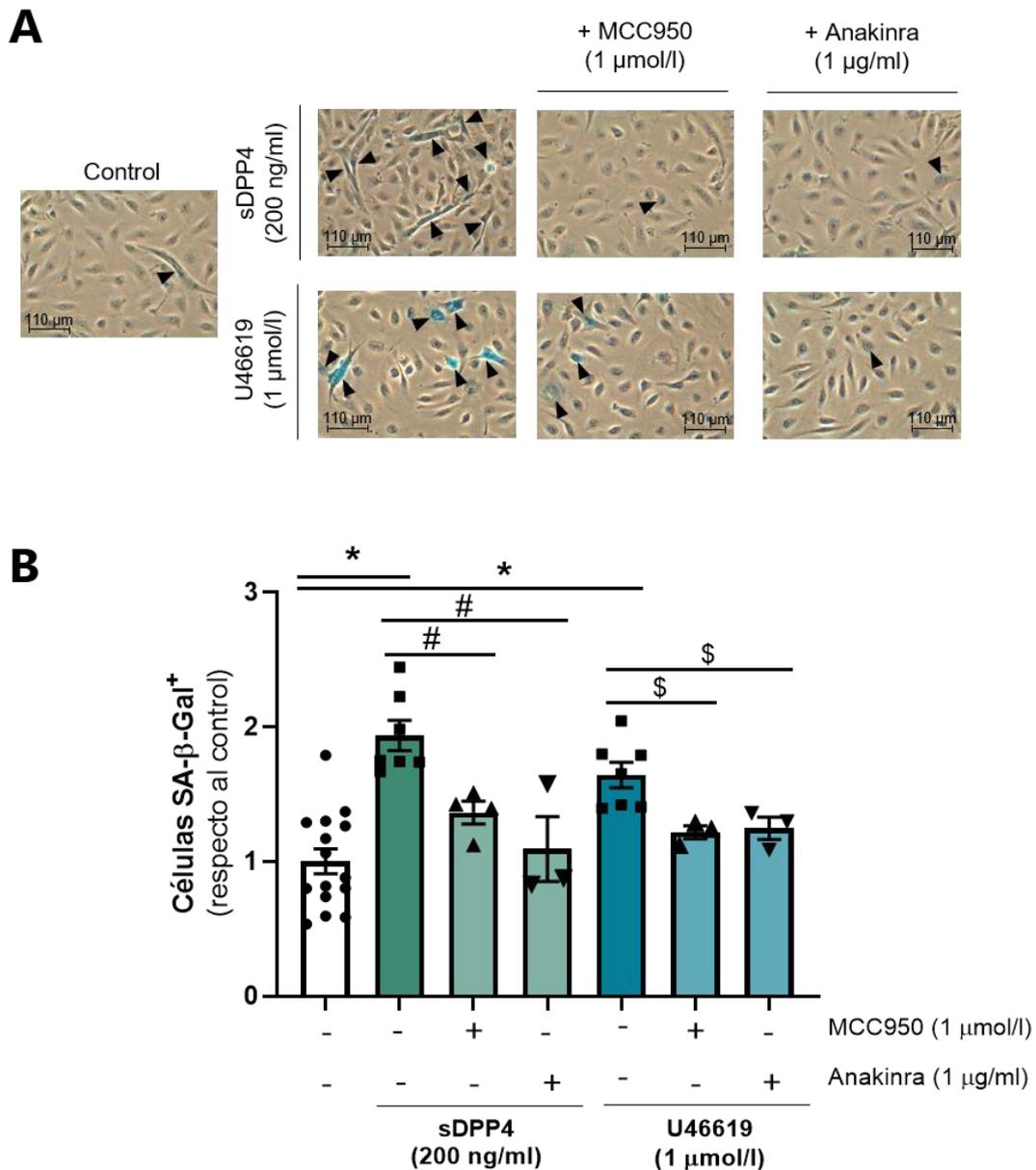


Figura 33. La activación del inflammasoma NLRP3 y su producto IL-1 β median la aparición de células senescentes en cultivo inducida por sDPP4 y TXA₂. Las HUVEC se expusieron durante 18h a sDPP4 (200 ng/ml) o U46619 (1 μ mol/l) solos o en combinación con MCC950 (1 μ mol/l) o anakinra (1 μ g/ml), y se determinó el porcentaje de las células senescentes en cultivo mediante la tinción de SA- β -gal. **(A)** Fotografías representativas en modo contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes teñidas en azul. **(B)** Cuantificación del número de células SA- β -gal⁺ respecto al número total de células. Se expresan los resultados como media \pm EEM de 4 experimentos independientes respecto al % de células SA- β -gal⁺ en el cultivo no tratado (control). (* p <0,05 frente al control, # p <0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), \$ p <0,05 frente a U46619 (1 μ mol/l), determinado por ANOVA de una vía).

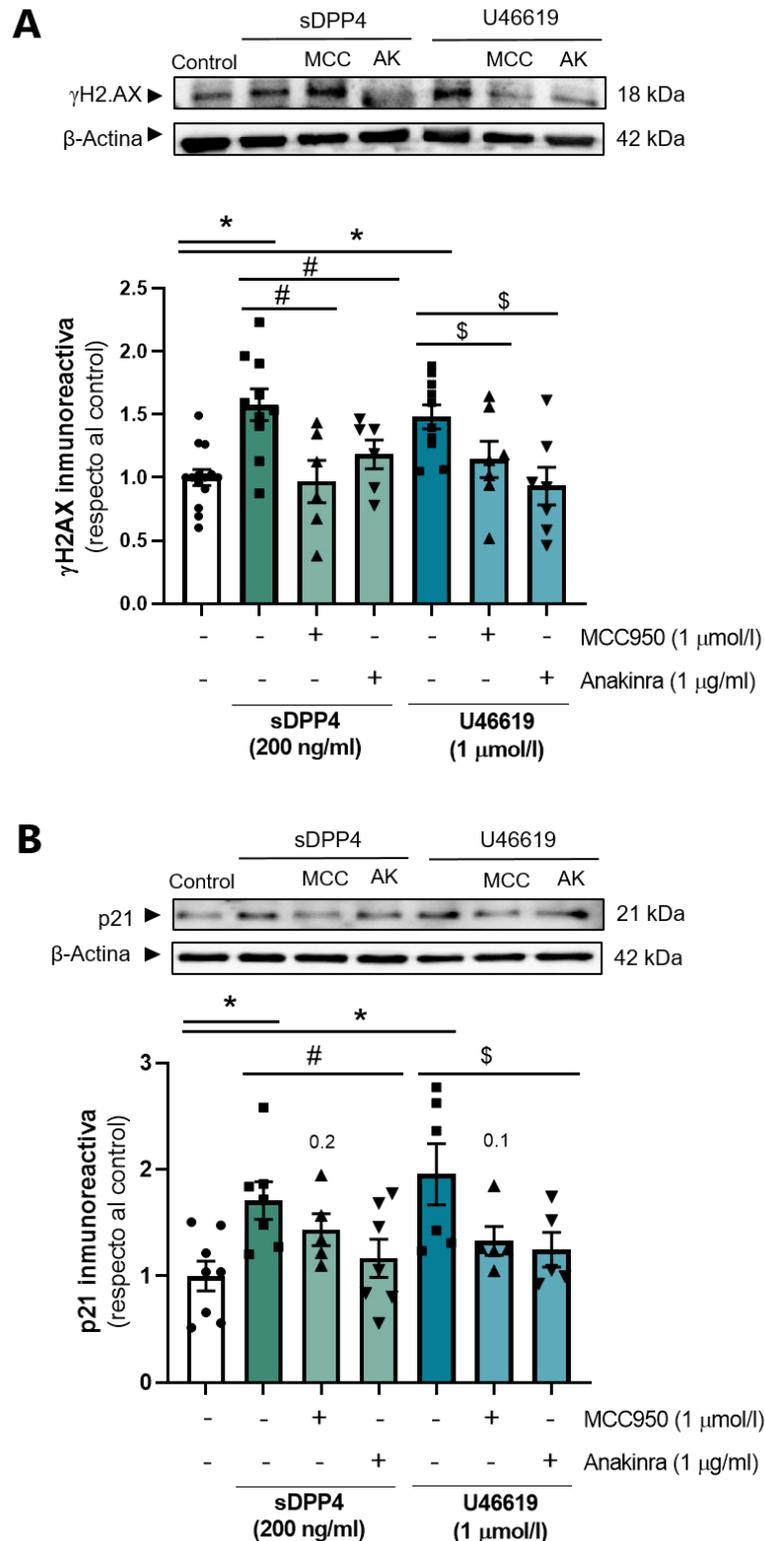


Figura 34. La activación del inflammasoma NLRP3 y su producto IL-1 β median el daño en el ADN y la parada del ciclo celular inducidos por sDPP4 y TXA₂. Las HUVEC se expusieron durante 18h a sDPP4 (200 ng/ml) o U46619 (1 μ mol/l) solos o en combinación con MCC950 (1 μ mol/l) o anakinra (1 μ g/ml), y se estudió por Western blot la expresión de **(A)** γ H2AX y **(B)** p21. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Los resultados se expresan como media \pm EEM de 6-8 experimentos independientes respecto al nivel de expresión en la condición control. (* p <0,05 frente al control, # p <0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), \$ p <0,05 frente a U46619 (1 μ mol/l), determinado por ANOVA de una vía). MCC: MCC950, AK: anakinra.

4. La inhibición de la actividad enzimática de DPP4 previenen su efecto pro-senescente *in vitro*

Una vez determinado el posible mecanismo celular que lleva a la inducción de senescencia endotelial por sDPP4, se evaluó el potencial terapéutico de los inhibidores de su actividad enzimática para prevenir el efecto de sDPP4 en el endotelio. Los inhibidores de DPP4 son fármacos antidiabéticos aprobados y hay un gran interés por evaluar su beneficio cardiovascular (Fei et al., 2019; Cefalu et al., 2018). Así, se evaluó el efecto *in vitro* del fármaco linagliptina, un inhibidor no-peptidomimético de DPP4 que se considera una de las tres gliptinas más usadas en la intervención clínica de la DMT2 (Fisman y Tenenbaum, 2015). Empleando la mínima concentración de linagliptina que había inhibido el efecto de sDPP4 sobre arterias mesentéricas de ratón en un estudio previo (Romacho et al., 2016), las HUVEC fueron expuestas a linagliptina (10 nmol/l) como tratamiento preventivo a la exposición a sDPP4 (200 ng/ml) y se evaluó la respuesta pro-senescente de la adipoquina. Se observó que linagliptina fue capaz de prevenir tanto el aumento en el porcentaje de células senescentes en el cultivo celular (**Figura 35A**), como la expresión de γ H2AX (**Figura 35B**) y p21 (**Figura 35C**) inducidos por sDPP4. Cabe destacar que, en algunos de los experimentos, se empleó en paralelo otro inhibidor experimental de la actividad dipeptidil peptidasa denominado K579, que posee una estructura química y mecanismo de acción diferente a linagliptina en la inhibición de DPP4 (Takasaki et al., 2004). El efecto de K579 (100 nmol/l) fue muy similar al ejercido por linagliptina (**Figura 35**), demostrando que la capacidad anti-senescente es común a la familia de los fármacos inhibidores de DPP4.

Para ratificar el papel de DPP4 como señal activadora del inflamasoma NLRP3, se evaluó si su actividad enzimática se requería para completar la activación del complejo. Se determinó que el tratamiento con linagliptina (10 nmol/l) o K579 (100 nmol/l) en presencia de sDPP4 (200 ng/ml) prevenía significativamente la inducción en la expresión de NLRP3 (**Figura 36A**), así como la formación de *specks* de ASC (**Figura 37**) y la expresión de IL-1 β madura como producto final de la activación del inflamasoma (**Figura 36B**).

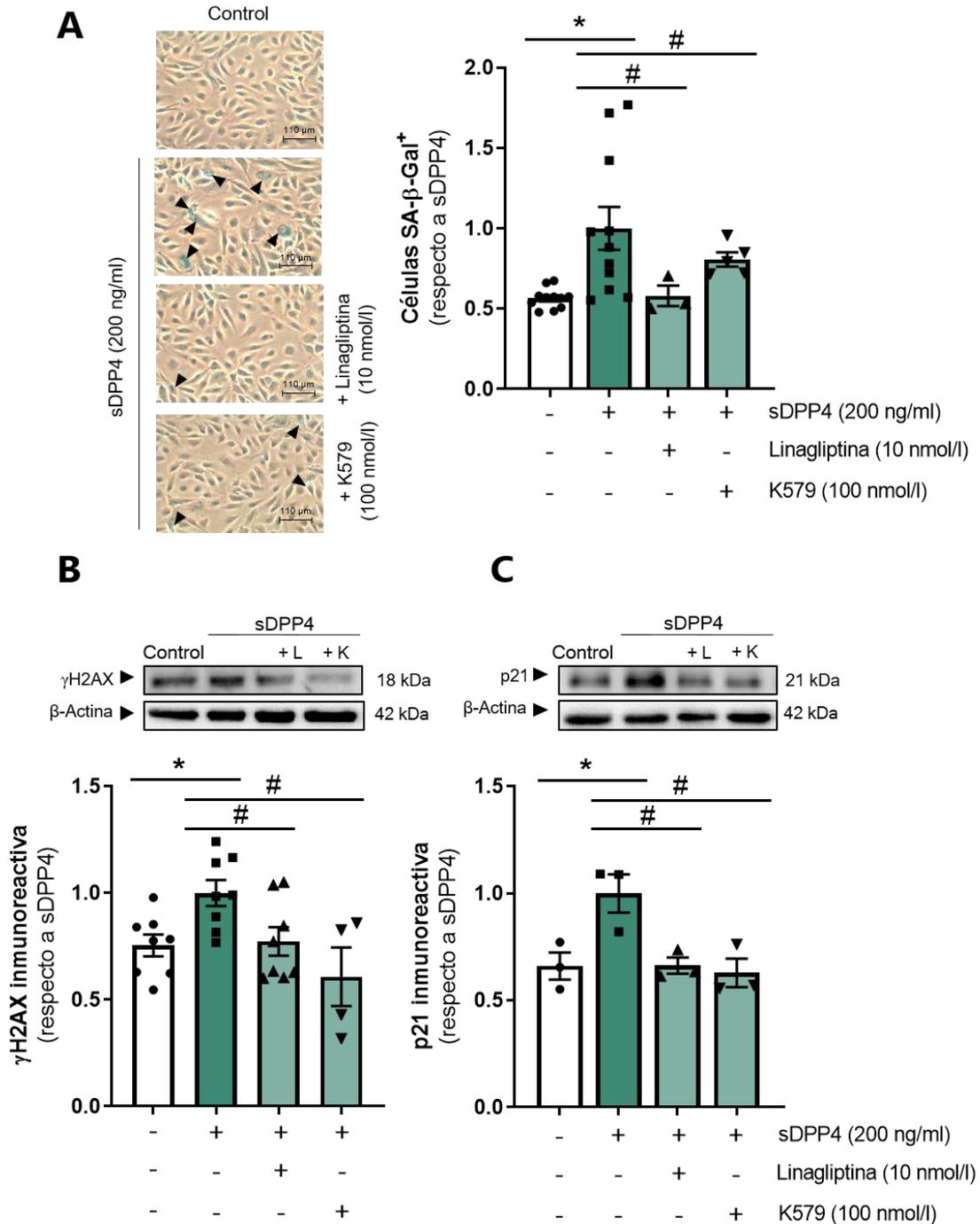


Figura 35. Los inhibidores de DPP4 previenen su actividad pro-senescente en el cultivo de HUVEC. Las células se expusieron durante 24h a sDPP4 (200 ng/ml) solo o en combinación con linagliptina (10 nmol/l) o K579 (100 nmol/l) y se determinó por un lado **(A)** el porcentaje de las células SA-β-gal⁺ respecto al número total de células. A la izquierda se muestran las fotografías representativas de la tinción de SA-β-gal en modo contraste de fase (200X). Las flechas indican las células senescentes teñidas en azul. Por otro lado, se estudió la expresión por Western blot de **(B)** γH2AX y **(C)** p21 en respuesta a los tratamientos indicados. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Se expresan los resultados como media ± EEM de 3-7 experimentos independientes respecto al efecto inducido por sDPP4 en cada caso (*p<0,05 frente al control, #p<0,05 frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía). L: linagliptina; K: K579.

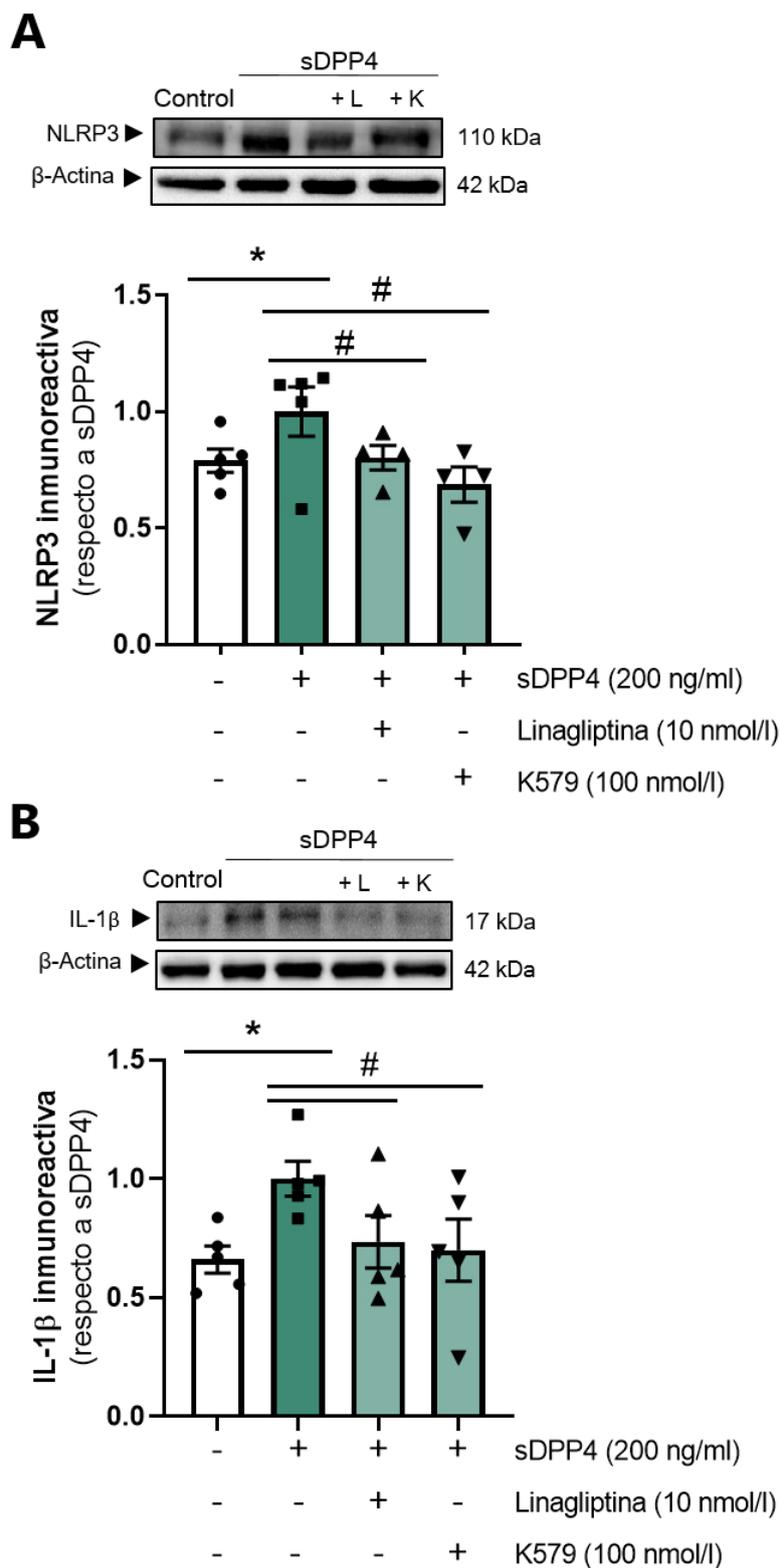


Figura 36. Los inhibidores de DPP4 previenen la activación del inflammasoma NLRP3 por sDPP4. Las HUVEC fueron estimuladas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de linagliptina (10 nmol/l) o K579 (100 nmol/l), y posteriormente se determinó por Western blot la expresión de **(A)** NLRP3, y de **(B)** IL-1β madura. En la parte superior se muestra un gel representativo de cada experimento. Los resultados se expresan como media ± EEM de 4-5 experimentos independientes respecto al nivel de expresión inducido por sDPP4 (* $p < 0,05$ frente control, # $p < 0,05$ frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía). L: linagliptina; K: K579.

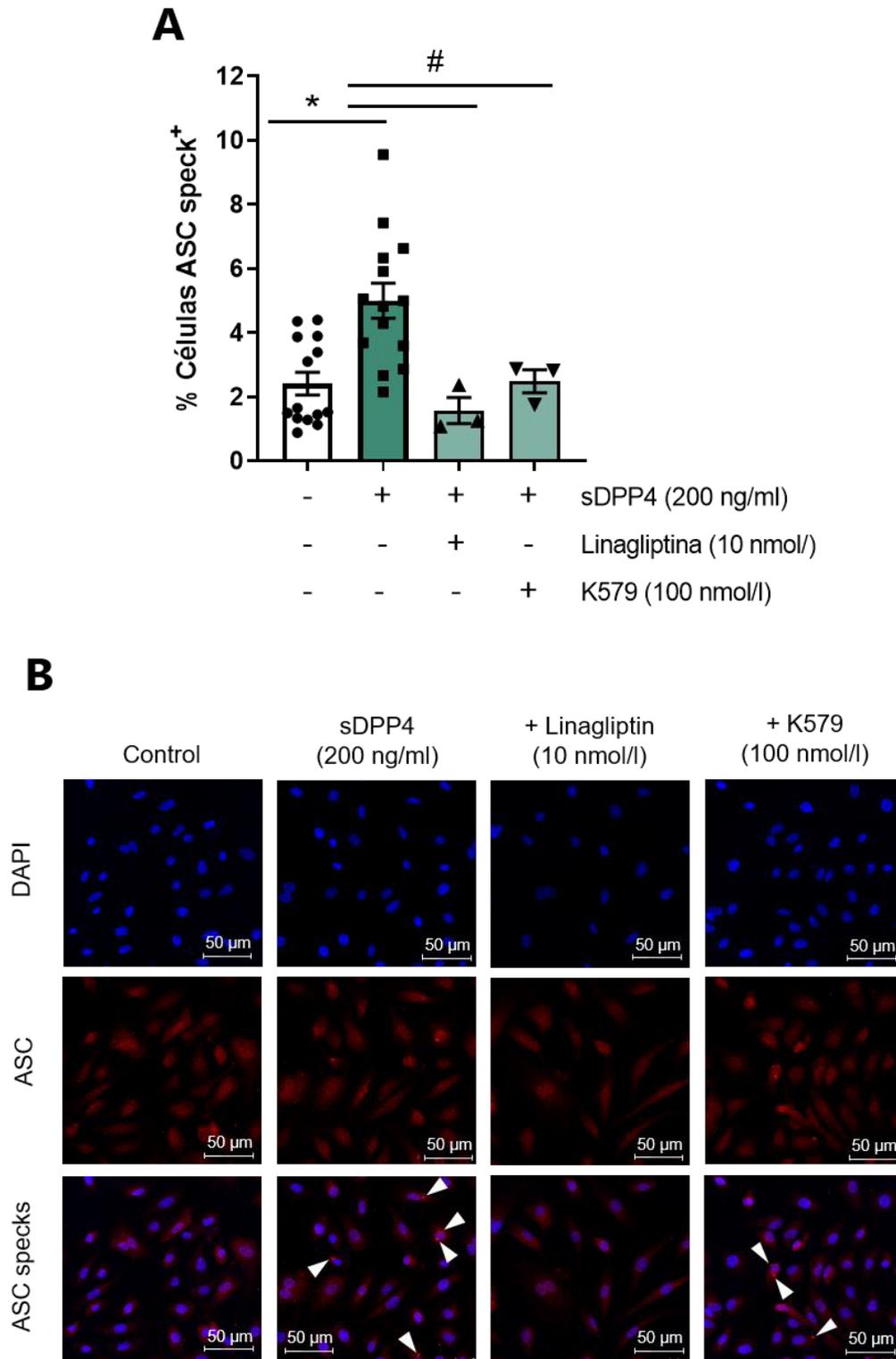


Figura 37. Los inhibidores de DPP4 previenen el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 por sDPP4. Las HUVEC fueron estimuladas durante 18h con sDPP4 (200 ng/ml) solo o en presencia de linagliptina (10 nmol/l) o K579 (100 nmol/l), se evaluó la activación del inflammasoma NLRP3 mediante la detección de *specks* de ASC por inmunofluorescencia indirecta. **(A)** El porcentaje de células con *specks* de ASC se cuantificó con respecto al número total de células en 17 campos aleatorios del cultivo. Los datos se expresan como media \pm EEM de 3 experimentos independientes. **(B)** Proyección de las imágenes tomadas en microscopía confocal (630X) tras la detección de los *specks* de ASC (rojo) sobre los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (azul) en respuesta a los tratamientos indicados (* $p < 0,05$ frente al % de células con *specks* en el cultivo no tratado, # $p < 0,05$ frente a sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de una vía).

PARTE II

sDPP4 COMO INDUCTOR DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN ARTERIAS MESENTÉRICAS HUMANAS

1. La adipocina sDPP4 induce disfunción endotelial en arterias mesentéricas humanas

La senescencia endotelial supone en sí misma un factor de riesgo para la progresión de la disfunción endotelial y sus consecuencias a nivel cardiovascular. Además, la disfunción endotelial es una de las primeras manifestaciones asociadas al envejecimiento vascular (Costantino et al., 2016). En este contexto, se examinó en qué medida sDPP4 podía afectar a la funcionalidad y la capacidad dilatadora de vasos de resistencia humanos. Para ello, se emplearon arterias mesentéricas aisladas de biopsias de omento de un grupo de adultos (edad media $56 \pm 2,6$ años), intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Fundación Jiménez Díaz. En este caso, los pacientes cumplían el criterio de presentar un IMC $< 30 \text{kg/m}^2$. El resto de parámetros bioquímicos y antropométricos se muestran en la **Tabla 5**.

Las arterias mesentéricas fueron aisladas y montadas en un miógrafo de pequeños vasos y pre-contraídas con KCl (35 mmol/l). A continuación, se evaluó su relajación en respuesta a concentraciones crecientes de BK (0,01 nmol/l a 10 $\mu\text{mol/l}$). Algunos de los segmentos arteriales se expusieron a sDPP4 (200 ng/ml) *ex vivo* durante 30 minutos previamente a la contracción con KCl. La presencia de sDPP4 (200 ng/ml) empeoró significativamente la relajación dependiente de endotelio de los microvasos humanos en respuesta a BK (**Figura 38**). Efectivamente, el valor del logaritmo de la concentración media efectiva (pEC_{50}) descendió significativamente en los segmentos tratados con sDPP4 ($pEC_{50}=5,88 \pm 0,19$) en comparación con los segmentos no tratados ($pEC_{50}=7,52 \pm 0,17$). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la contracción máxima de los microvasos en respuesta a KCl en ninguno de los casos (**Anexo 2**).

1.1. Los inhibidores de DPP4 previenen la inducción de disfunción endotelial *ex vivo* en arterias mesentéricas humanas

En vista de la capacidad de sDPP4 para inducir tanto senescencia endotelial *in vitro* como disfunción endotelial *ex vivo*, se estudió la posibilidad de que ambos eventos estuvieran relacionados. En primer lugar, se evaluó si, como en el caso de la inducción de senescencia, los inhibidores de DPP4 eran capaces de bloquear la acción deletérea de DPP4 en la relajación dependiente de endotelio en arterias mesentéricas humanas. Éstas fueron incubadas en el baño con linagliptina (10 nmol/l) durante los 30 minutos previos a la exposición a sDPP4 (200 ng/ml), y posteriormente se procedió con el protocolo de contracción y relajación en respuesta a BK. El tratamiento con linagliptina abolió completamente la disfunción endotelial inducida por sDPP4 (**Figura 38A**).

1.2. El eje PAR2-COX-2-TP y el inflamasoma NLRP3 median la disfunción endotelial inducida por sDPP4

A continuación, se estudió la posible implicación del eje PAR2-COX-2-TP en el mecanismo de inducción de disfunción endotelial por sDPP4. Algunos de los segmentos arteriales fueron pre-incubados con GB83 (10 μ mol/l), antagonista del receptor PAR2 o SQ 29,548 (10 μ mol/l), antagonista del receptor TP, previamente a la exposición de sDPP4. Tanto el bloqueo de PAR2 y TP prevenía significativamente la disfunción endotelial inducida por sDPP4 (**Figura 38B y 38C**). Igualmente, se estudió la implicación del inflamasoma NLRP3 y del producto de su activación IL-1 β mediante el pre-tratamiento de las arterias mesentéricas con MCC950 (1 μ mol/l) o anakinra (1 μ g/ml) en el miógrafo. Tanto MCC950 como anakinra previnieron el deterioro de la relajación vascular inducida por sDPP4 (200 ng/ml) de forma significativa (**Figura 39A y 39B**).

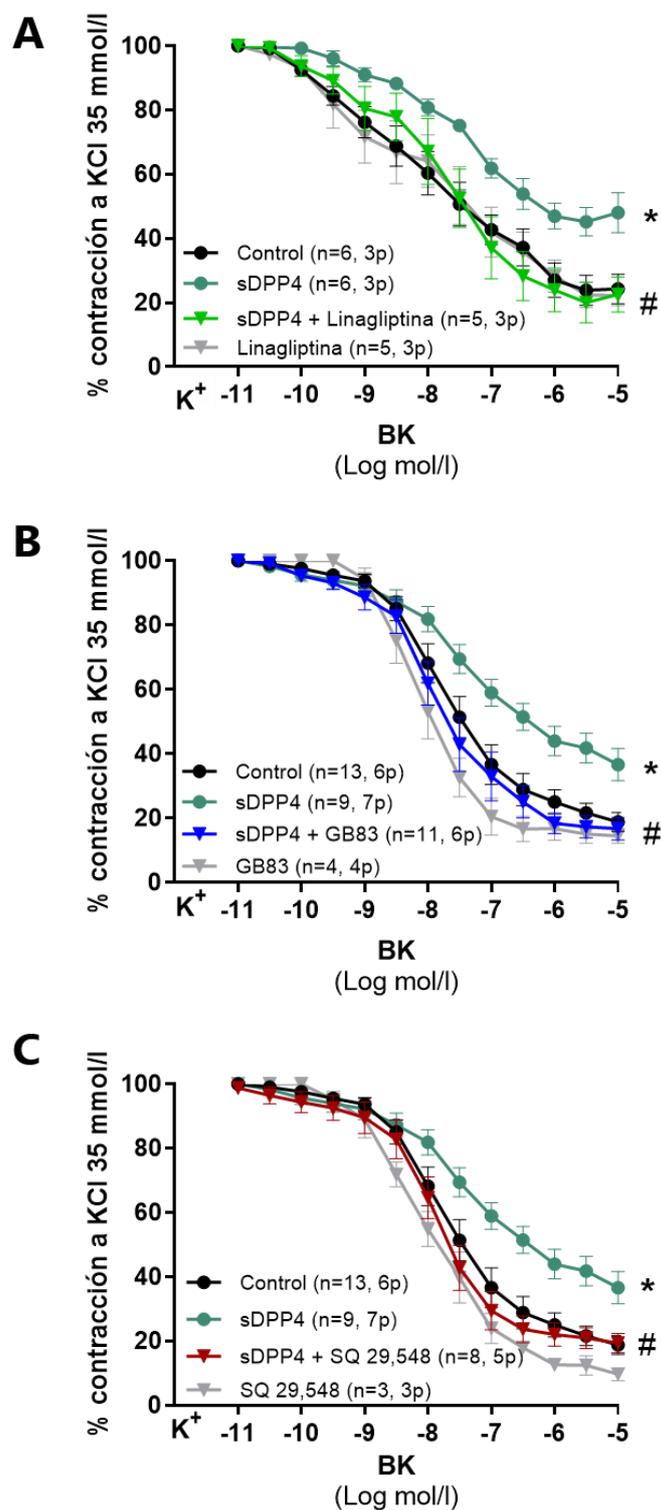


Figura 38. sDPP4 empeora la relajación dependiente de endotelio de arterias mesentéricas humanas mediante su actividad enzimática y la activación de PAR2 y COX-2. Los microvasos mesentéricos aislados de biopsias de epiplon de sujetos control fueron expuestas a sDPP4 (200 ng/ml) solo o en combinación con **(A)** linagliptina (10 nmol/ml), **(B)** GB83 (10 μ mol/l) o **(C)** SQ 29,548 (10 μ mol/l), y se evaluó la relajación dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de BK. En las curvas se muestran los valores (media \pm EEM) del porcentaje de contracción a KCl 35 mmol/l de todos los segmentos arteriales (n) que provienen de al menos 3 donantes (p) para cada una de las condiciones. (* $p < 0,05$ frente a la curva de los microvasos no tratados, # $p < 0,05$ frente a la respuesta inducida por sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de dos vías).

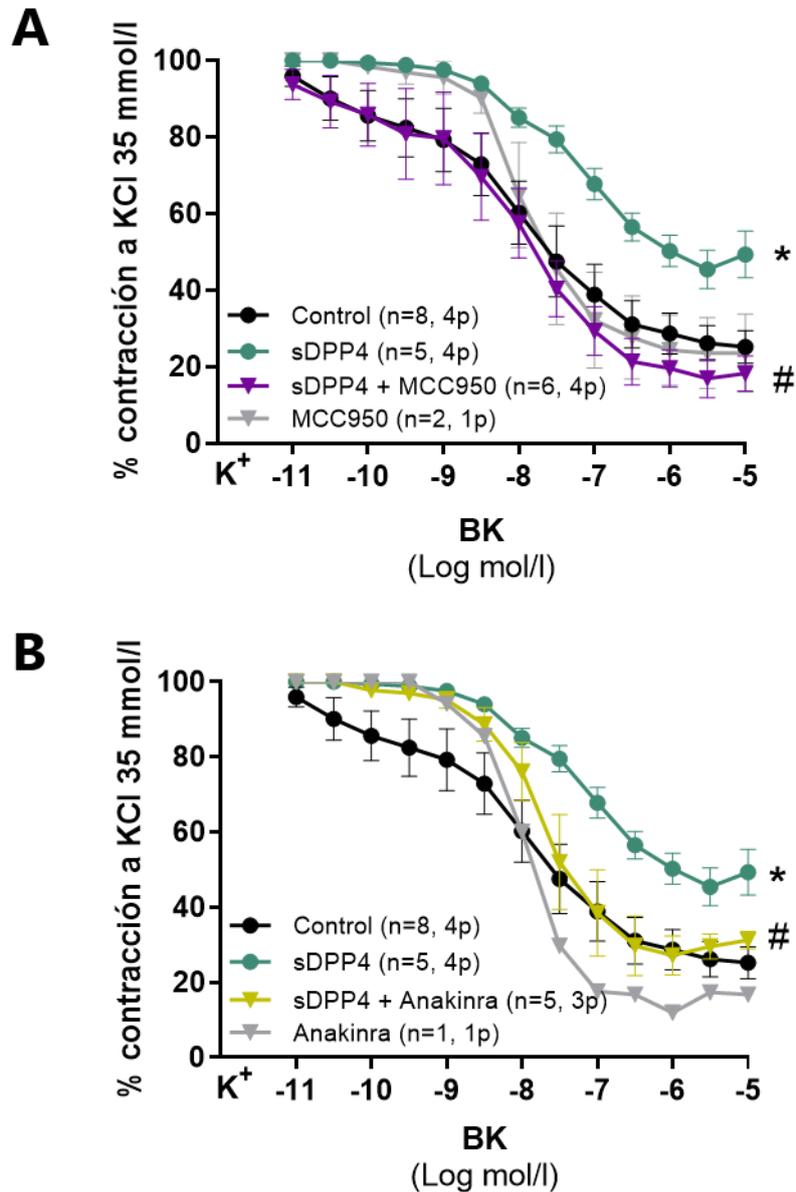


Figura 39. La activación del inflammasoma NLRP3 y su producto IL-1 β participan en la disfunción endotelial inducida por sDPP4 *ex vivo* en arterias mesentéricas humanas. Los microvasos mesentéricos aislados de biopsias de epiplon de sujetos control fueron expuestos a sDPP4 (200 ng/ml) solo o en combinación con **(A)** MCC950 (1 μ mol/l) o **(B)** anakinra (1 μ g/ml), previamente a evaluar la relajación dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de BK. En las curvas se muestran los valores (media \pm EEM) del porcentaje de contracción a KCl 35 mmol/l de todos los segmentos arteriales (n) que provienen de al menos 3 donantes (p) para cada una de las condiciones. (*p<0,05 frente a la curva de los microvasos no tratados, #p<0,05 frente a la respuesta inducida por sDPP4 (200 ng/ml), determinado por ANOVA de dos vías).

PARTE III

IMPLICACIÓN DE DPP4 COMO MEDIADOR DE ENVEJECIMIENTO VASCULAR E INFLAMACIÓN EN LA OBESIDAD HUMANA

1. Las arterias mesentéricas de pacientes obesos presentan una función vascular comprometida e inversamente relacionada con su IMC

El siguiente objetivo fue determinar el papel de sDPP4 y su posible inhibición en el contexto patológico de una enfermedad humana asociada al envejecimiento vascular, como es la obesidad. En colaboración con el servicio de cirugía del aparato digestivo en el Hospital Fundación Jiménez Díaz, se tuvo acceso a una cohorte de pacientes que cumplían los criterios para participar en este estudio. Además de pacientes controles, cuyas arterias mesentéricas se emplearon para evaluar la capacidad de DPP4 en el deterioro de la función vascular, se tuvo acceso a muestras de omento de un grupo complementario de pacientes obesos ($IMC \geq 30\text{kg/m}^2$). Los parámetros bioquímicos y antropométricos completos se muestran en la **Tabla 5**. Cabe destacar que, del total de sujetos que cumplían los criterios para participar en el estudio, dos pacientes fueron excluidos debido a una manipulación inapropiada de las biopsias de omento. En algunas ocasiones, el contenido en arterias mesentéricas fue tan escaso que no se pudieron realizar los experimentos de reactividad vascular. En la **Figura 40** se muestra la relación de participantes y la información obtenida en cada uno de ellos.

En primer lugar, se estudió la función vascular de las arterias mesentéricas del grupo de pacientes obesos en comparación con el grupo control. Se observó que los segmentos arteriales de estos pacientes presentaban un deterioro significativo de la relajación dependiente de endotelio en respuesta a BK en comparación con el grupo control (**Figura 41A**). Así, el valor pEC_{50} en respuesta a BK fue de $7,52 \pm 0,17$ en el grupo control y de $6,10 \pm 0,16$ en el grupo de pacientes obesos (**Anexo 1**). Sin embargo, no se identificaron diferencias significativas en la relajación independiente de endotelio desarrollada por las arterias de ambos grupos en respuesta a SNP (**Figura 41B**). Se analizó además la asociación entre el IMC de los pacientes y los valores pEC_{50} en respuesta a BK obtenidos en los ensayos de reactividad vascular, observando una asociación inversa y significativa entre ambas variables (**Figura 41C**).

Tabla 5. Datos antropométricos y bioquímicos de las personas donantes de epiplon. Los datos han sido extraídos de las historias clínicas y los datos de la analítica preoperatoria por el personal sanitario en el Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España). El análisis estadístico se ha realizado en el laboratorio. * $p < 0,05$ respecto al valor medio para el grupo control, determinado por t-test no pareado. PA: presión arterial.

Grupo	n	Edad años	IMC kg m^{-2}	Glucosa basal mg/dl	Colesterol total mg/dl	PA sistólica mmHg	PA diastólica mmHg
Control	19	56 \pm 2	24,10 \pm 0,92	93,16 \pm 1,77	178,6 \pm 11,6	122,4 \pm 4,30	76,53 \pm 2,76
Obesos	15	45 \pm 3*	39,70 \pm 1,74*	101,90 \pm 3,24*	183,9 \pm 9,77	132,3 \pm 4,16	82,15 \pm 2,12*

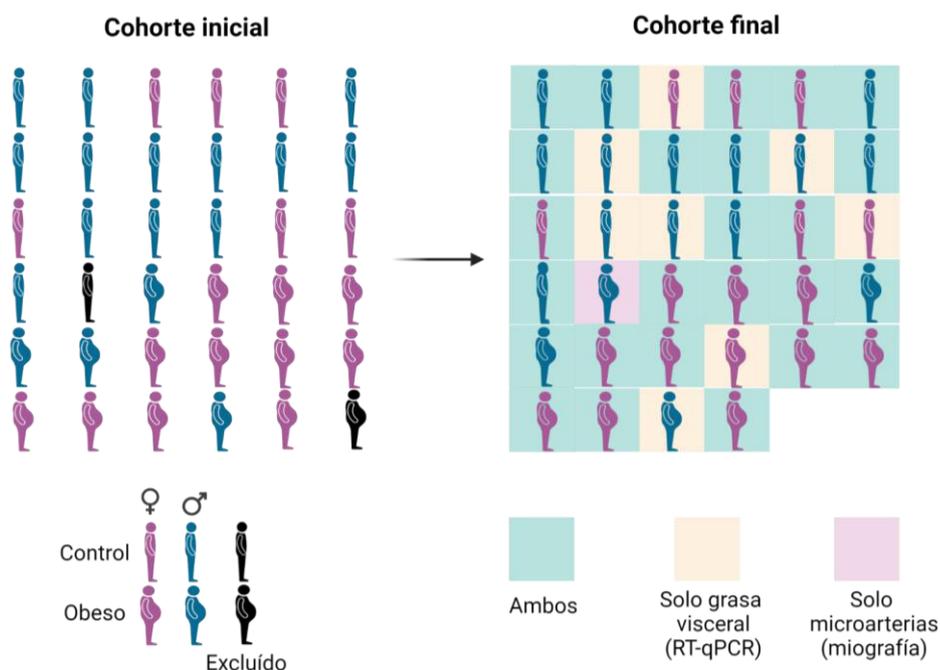


Figura 40. Representación gráfica de la población objeto de estudio. La cohorte inicial de sujetos reclutados para participar en el estudio estaba compuesta por 20 sujetos control (IMC $< 30 \text{ kg/m}^2$, 30% mujeres) y 16 pacientes obesos (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, 75% mujeres). Tras la obtención de las biopsias de omento, un sujeto de cada grupo fue excluido. Por otro lado, tras el procesamiento en el laboratorio, algunas de las biopsias no presentaban suficiente tejido vascular para aislar las arterias mesentéricas para realizar experimentos de reactividad. La cohorte final ha consistido en 19 sujetos control y 15 pacientes obesos. Se han obtenido en total 26 muestras de segmentos arteriales para los experimentos de miografía y 33 muestras de grasa visceral para los experimentos de RT-qPCR.

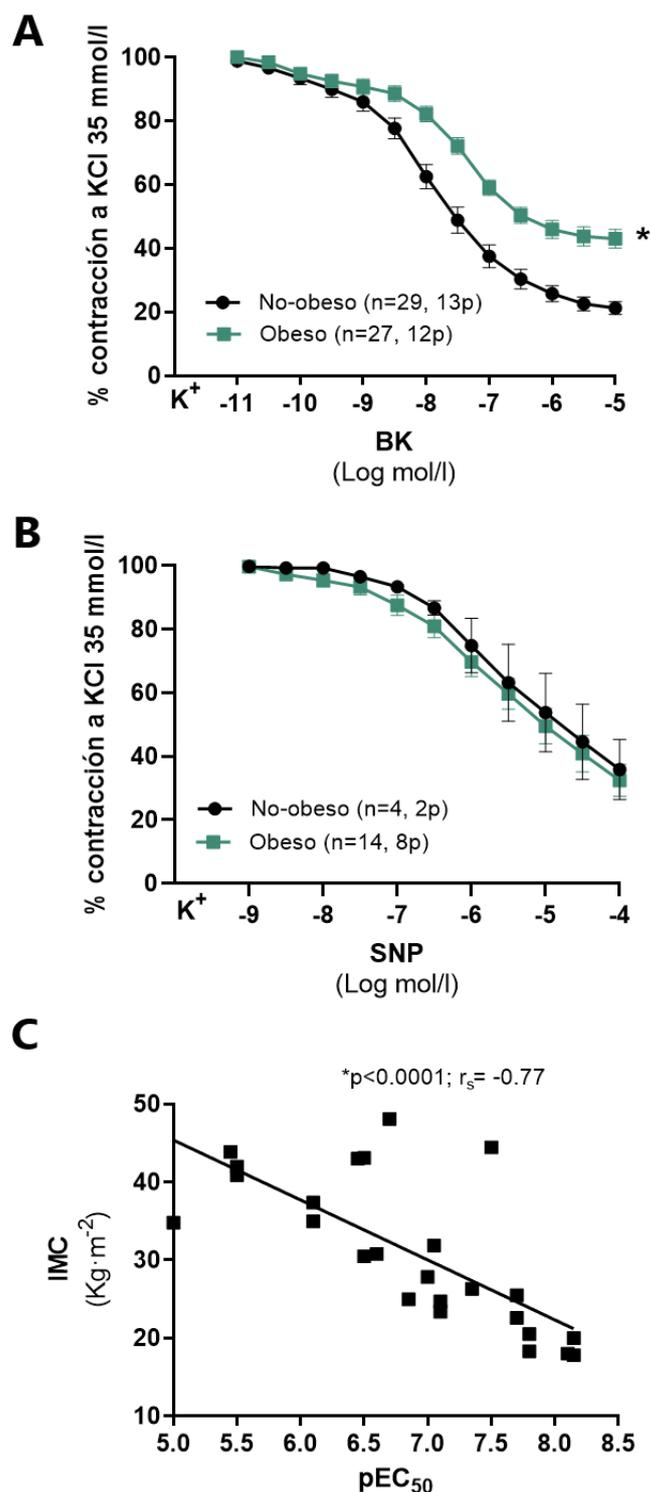


Figura 41. Los pacientes obesos presentan una función vascular comprometida en comparación con sujetos control. Las microarterias mesentéricas aisladas de biopsias de donantes, clasificados en el grupo control no-obeso u obesos de acuerdo a su IMC, se montaron en un miógrafo de pequeños vasos, se contrajeron con KCl 35mmol/l y se evaluó su capacidad de relajación en respuesta a concentraciones crecientes de **(A)** BK o **(B)** SNP. En las curvas se muestran los valores (media ± EEM) del porcentaje de contracción a KCl 35 mmol/l de todos los segmentos arteriales (n) que provienen de al menos 3 pacientes donantes (p) para cada una de las condiciones. (*p<0,05 frente a la curva de los microvasos del grupo control, determinado por ANOVA de dos vías). Por otro lado, se realizó un **(C)** análisis de correlación lineal entre el valor de IMC y de pEC₅₀ en respuesta a BK de las microarterias para cada uno de los pacientes. El p-valor calculado y el coeficiente de Spearman (rs) se indican en la parte superior del gráfico.

2. La expresión de DPP4 en el tejido visceral se asocia positivamente con una función vascular deteriorada

Con el objetivo de buscar explicación a la diferencia funcional de las arterias mesentéricas en ambos grupos de pacientes, se analizó el contexto tisular del que provenían dichas arteras. El tejido adyacente a las arterias mesentéricas empleadas en los experimentos funcionales era tejido adiposo visceral que también fue procesado para su análisis molecular. En primer lugar, se estudió la expresión local de ARNm de DPP4 por RT-qPCR, que fue significativamente más elevada en las biopsias de tejido adiposo visceral de los pacientes obesos (**Figura 42A**). Cuando se analizó la relación entre la expresión de DPP4 y las variables mostradas anteriormente, se observó que el nivel local de DPP4 tenía una asociación significativa y directa con el IMC de los pacientes (**Figura 42B**), así como con una peor relajación vascular de acuerdo al valor de pEC50 calculado para los segmentos arteriales en respuesta a BK (**Figura 42C**). Con respecto al resto de parámetros bioquímicos y antropométricos obtenidos de la cohorte de pacientes que se muestran en la **Tabla 5**, solamente la PA diastólica estableció también una asociación directa y significativa con la expresión en la grasa visceral de DPP4, aunque con menor potencia estadística, según el coeficiente de Spearman calculado (**Figura 42D**).

3. La expresión de mediadores pro-senescentes y proinflamatorios está aumentada en el tejido visceral de los pacientes obesos

Se ha propuesto que el estado de inflamación crónica de bajo grado asociado a la obesidad es causa y consecuencia de la disfunción y senescencia del tejido adiposo (Zamboni et al., 2021). Con el objetivo de estudiar el perfil de expresión completo en las biopsias de tejido adiposo, también se cuantificó la expresión de ARNm de los marcadores pro-senescentes p53, p21 y p16, así como de los genes asociados al inflammasoma NLRP3, IL-1 β e IL-18. El mapa de calor representado en la **Figura 43A** presenta que la expresión relativa de estos factores es más elevada en la grasa visceral de los pacientes obesos que en el grupo control, validando un microambiente pro-senescente y proinflamatorio en la cercanía de la vasculatura mesentérica. Los gráficos detallados donde se observa la dispersión de la expresión de cada uno de los genes en cada grupo se muestran en las **Figuras 43B-G**.

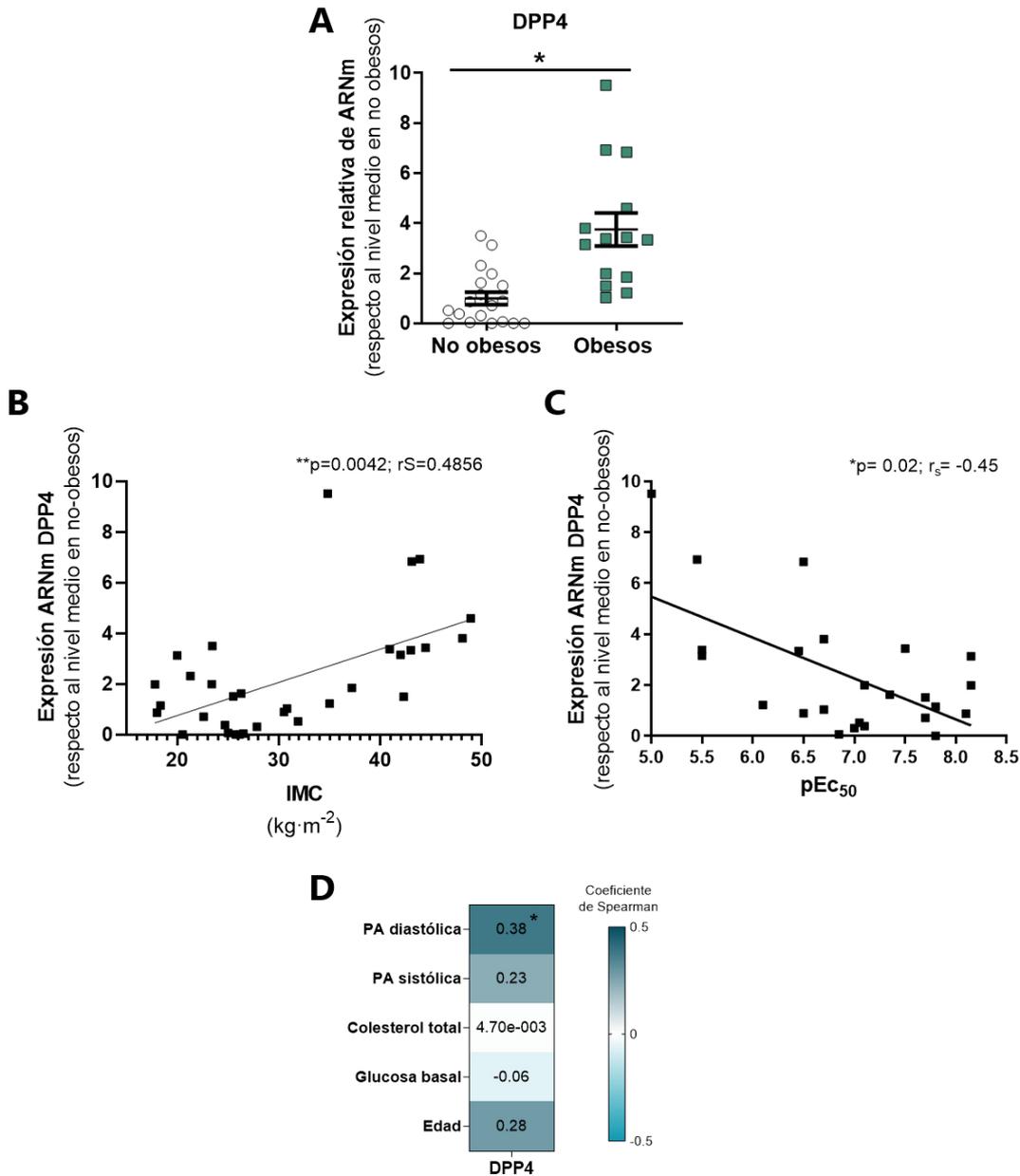


Figura 42. La expresión local de DPP4 en el tejido adiposo visceral está asociada al IMC y la función vascular de las arterias mesentéricas cercanas. **(A)** Se estudió la expresión del mRNA de DPP4 mediante RT-qPCR en los explantes de tejido adiposo visceral del grupo de sujetos control y pacientes obesos. Se muestran el valor medio \pm EEM para cada grupo, donde cada punto representa el valor de expresión relativa de DPP4 de cada sujeto respecto al nivel medio en el grupo control, normalizado respecto al nivel de expresión del ARNr 18S (*p<0,05 respecto al grupo control determinado por t-test no pareado). Posteriormente, se realizó un análisis de correlación lineal entre el nivel de expresión de DPP4 en el tejido adiposo visceral y **(B)** el IMC o **(C)** el valor de pEC₅₀ en respuesta a BK de las microarterias para cada uno de los pacientes. Cada punto representa los datos de un sujeto, como coordenada del valor de cada pareja de variables. El p-valor calculado y el coeficiente de Spearman (r_s) en cada caso se indican en la parte superior de los gráficos. **(D)** En un segundo análisis, se determinó la asociación entre la expresión de DPP4 y los parámetros antropométricos y bioquímicos (edad, glucosa basal, colesterol total, PA diastólica, PA sistólica) de los donantes de epiplon. Se muestra el coeficiente de Spearman calculado en cada caso.

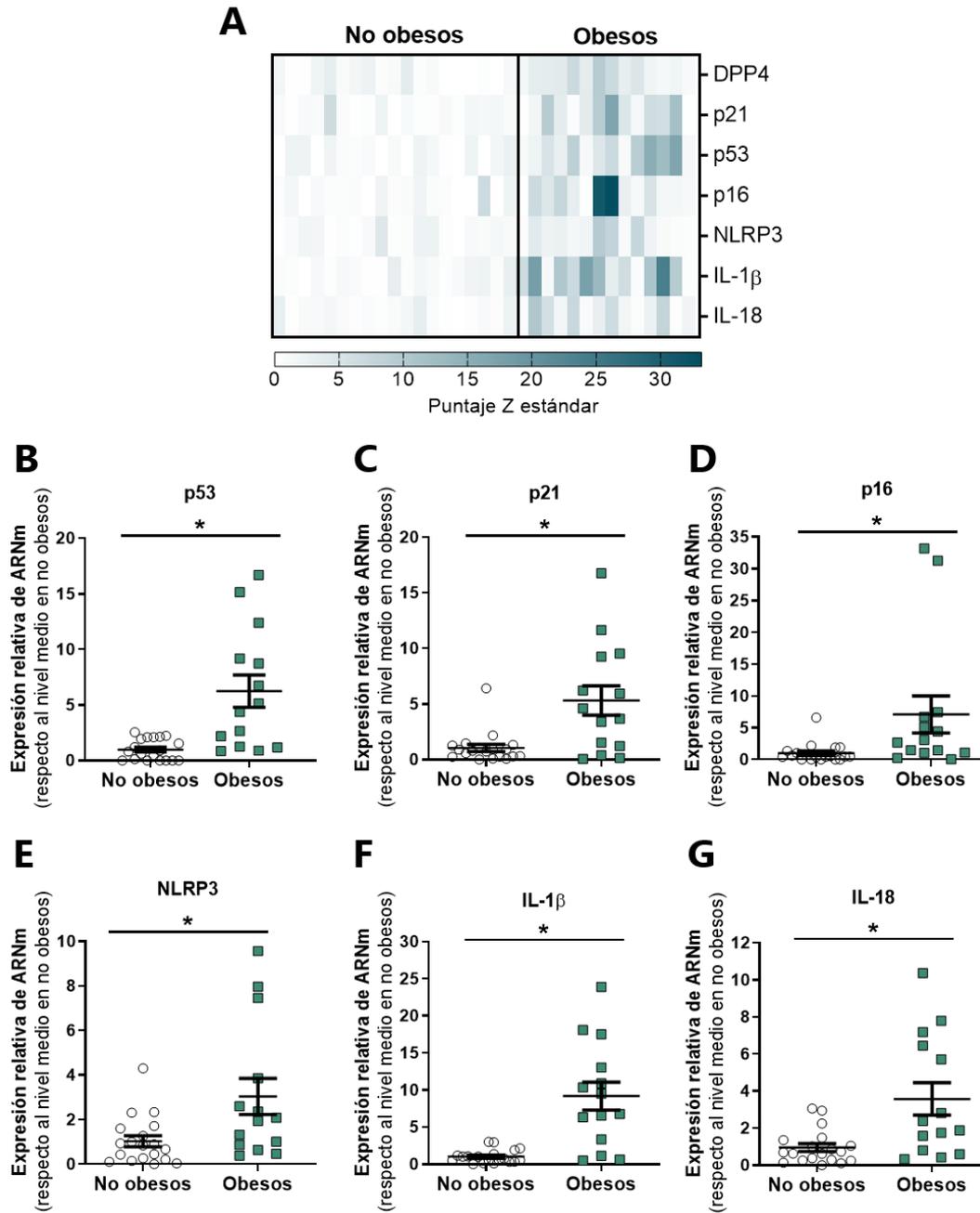


Figura 43. El tejido adiposo visceral de los pacientes obesos expresa niveles elevados de marcadores pro-senescentes y proinflamatorios en comparación con sujetos control. Se estudió el perfil de expresión local de la grasa visceral obtenida de las biopsias de sujetos control y pacientes obesos. En el panel **(A)** se muestra el mapa de calor (*heatmap*) con la expresión relativa en el tejido adiposo visceral determinado por RT-qPCR de DPP4, los marcadores pro-senescentes p53, p21 y p16 y de los componentes y productos del inflammasoma NLRP3, IL-1 β e IL-18 en cada paciente, representado por cada una de las columnas en el gráfico. La intensidad de color representa la expresión de cada uno de los genes con respecto al valor medio en el grupo control y normalizado respecto al nivel de expresión del ARNr 18S. En los paneles **(B-G)** se muestra la expresión individual de cada uno de los genes. Se muestran el valor medio \pm EEM para cada grupo, donde cada punto representa el valor de expresión relativa de cada marcador de cada sujeto, respecto al nivel medio en el grupo control normalizado respecto al nivel de expresión del ARNr 18S (* $p < 0,05$ respecto al grupo control determinado por el test de Mann-Whitney en todos los casos excepto en la expresión de p53 donde se empleó un t-test no pareado).

4. El bloqueo local de DPP4 y su mecanismo pro-senescente mejora la función endotelial de las arterias mesentéricas en sujetos obesos

4.1. La expresión local de DPP4 está asociada positivamente a la expresión de marcadores pro-senescentes en la grasa visceral

Para determinar la contribución relativa de DPP4 al ambiente proinflamatorio y pro-senescente descrito en el tejido adiposo visceral de los pacientes obesos en comparación con el grupo control, se analizó la posible asociación entre la expresión local de DPP4 y el resto de factores pro-senescentes analizados. El análisis de correlación lineal indicó que el nivel de expresión de DPP4 en la grasa visceral establece una asociación directa y significativa con la expresión de p53, p21 y p16 en el mismo tejido (**Figura 44A, 44B y 44C**).

4.2. El bloqueo local del eje PAR2-COX-2-TP revierte la disfunción endotelial de sujetos obesos *ex vivo*

En vista de los resultados anteriores, se decidió evaluar en qué medida el bloqueo del mecanismo pro-senescente inducido por DPP4 en el endotelio podría afectar a la disfunción endotelial de los microvasos de pacientes obesos. Para ello, en los ensayos de reactividad de las microarterias mesentéricas, los segmentos arteriales se expusieron a GB83 (10 $\mu\text{mol/l}$) o SQ 29,548 (10 $\mu\text{mol/l}$) durante 30 minutos previamente a la contracción con KCl y la evaluación de la relajación dependiente de endotelio en respuesta a BK, en ausencia de DPP4. Estos fármacos no habían ejercido variaciones significativas en las respuestas de las arterias mesentéricas del grupo control (**Figura 38**). Sin embargo, se observó que la exposición de las arterias mesentéricas de los pacientes obesos a los antagonistas de PAR2 (**Figura 45A**) o TP (**Figura 45B**) revertía completamente la disfunción endotelial que mostraban las arterias no tratadas. Los valores de pEC50 en respuesta a BK calculados fueron $7,54 \pm 0,23$ para GB83 y $7,15 \pm 0,34$ para SQ 29,548 (**Anexo 1**), los cuales son similares al calculado para la función vascular de las arterias de los pacientes control no obesos ($7,52 \pm 0,17$).

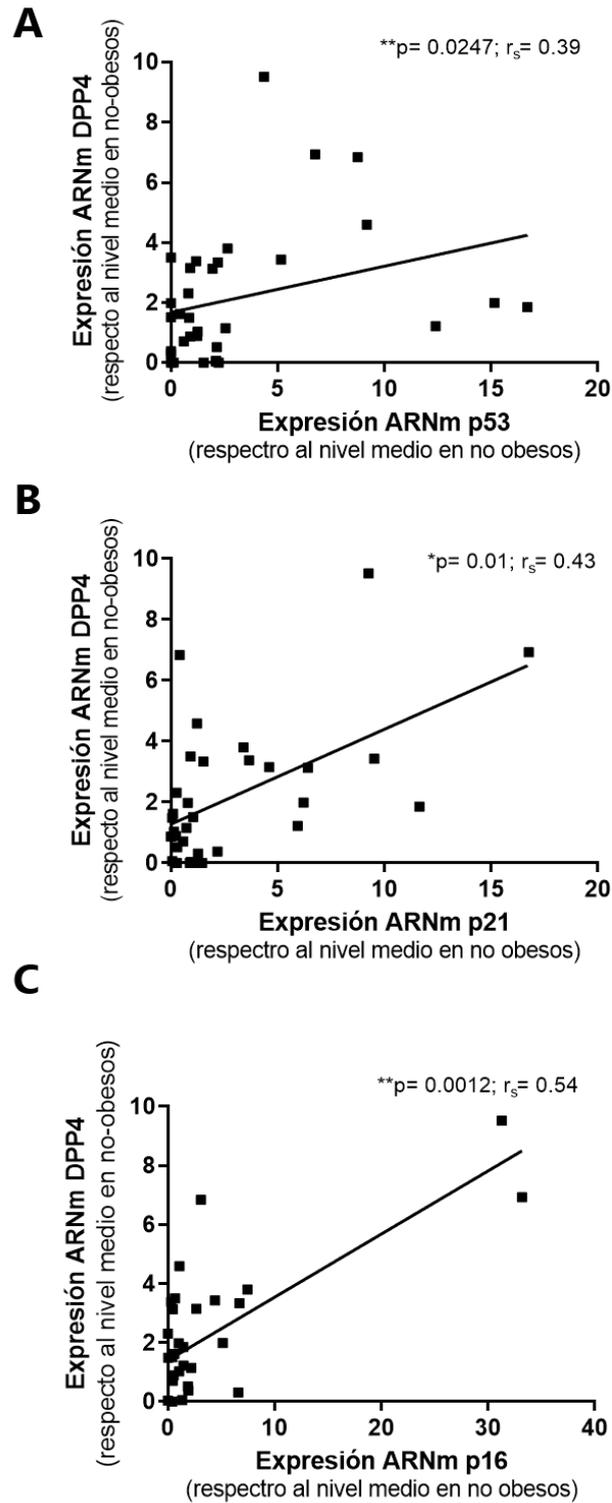


Figura 44. La expresión de DPP4 está asociada positivamente a la expresión de marcadores pro-senescentes en el tejido adiposo visceral. Se determinó el nivel local de expresión de diversos mediadores en los explantes de grasa visceral obtenidos de sujetos control y pacientes obesos mediante RT-qPCR. Posteriormente se realizó un análisis de correlación lineal entre el nivel de expresión de DPP4 en el tejido adiposo visceral y la expresión de **(A)** p53, **(B)** p21 o **(C)** p16. Cada punto representa los datos de un sujeto, como coordenada del valor de expresión relativa de cada pareja de marcadores. La expresión se ha calculado respecto al nivel medio en el grupo control normalizado respecto al nivel de expresión del ARNr 18S. El p-valor calculado y el coeficiente de Spearman (r_s) en cada caso se indican en la parte superior de los gráficos.

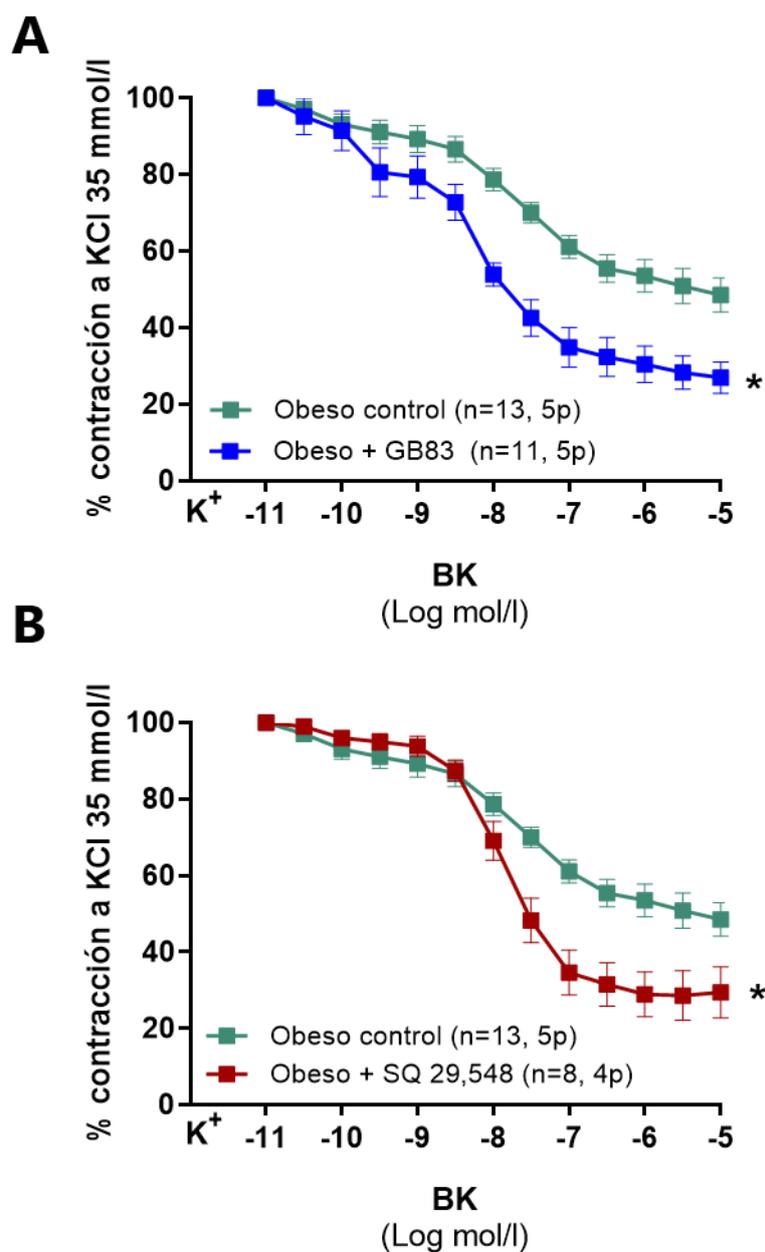


Figura 45. La disfunción endotelial en las arterias mesentéricas de sujetos obesos puede revertirse por bloqueo *ex vivo* de PAR2 y TP. Los microvasos mesentéricos aislados de biopsias de pacientes obesos fueron expuestos a **(A)** GB83 (10 μ mol/l) o **(B)** SQ 29,548 (10 μ mol/l), previamente a evaluar la relajación dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de BK. En las curvas se muestran los valores (media \pm EEM) del porcentaje de contracción a KCl 35 mmol/l de todos los segmentos arteriales (n) que provienen de al menos 3 pacientes donantes (p) para cada una de las condiciones. (* $p < 0,05$ frente a la curva de los microvasos no tratados, determinado por ANOVA de dos vías).

4.3. El bloqueo local del inflammasoma NLRP3 y de IL-1 β no modifica la función endotelial de sujetos obesos *ex vivo*

Siguiendo con el mecanismo pro-senescente inducido por sDPP4 en el endotelio, también se evaluó en qué medida la inhibición de la activación del inflammasoma NLRP3 podía influenciar la función de la microvasculatura de los pacientes obesos. Así, las arterias mesentéricas se trataron en el miógrafo con MCC950 (1 μ mol/l) o anakinra (1 μ g/ml) en ausencia de DPP4, previamente al ensayo de contracción y relajación en respuesta a BK. Se observó que el bloqueo del ensamblaje del complejo inflammasoma por MCC950 o el bloqueo de los receptores de su producto IL-1 β con anakinra no tenía efecto significativo en la relajación dependiente de endotelio desarrollada por las arterias mesentéricas de pacientes obesos (**Figura 46A y 46B**). En valor pEC50 en respuesta a BK en las arterias tratadas con MCC950 fue de $5,63 \pm 0,33$ y en las expuestas a anakinra de $5,35 \pm 0,35$, sin variación significativa con respecto al valor medio calculado para las arterias intactas del grupo de pacientes obesos ($6,10 \pm 0,16$).

4.4 La expresión de DPP4 está asociada positivamente a la expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3 en la grasa visceral

A la luz de los resultados obtenidos en los experimentos funcionales con el bloqueo del inflammasoma NLRP3, se estudió en qué medida la expresión de los componentes y productos del mismo se asociaban a la expresión de DPP4 en la grasa visceral. El análisis de correlación lineal determinó que la expresión de DPP4 establece sendas asociaciones significativas y positivas con el nivel de expresión de NLRP3, IL-1 β e IL-18 (**Figura 47A, 47B y 47C**). Además, cuando se realizó el análisis de correlación lineal entre la expresión de estos genes y los valores pEC50 calculados en respuesta a BK, se observó que una peor función vascular se asoció significativa y positivamente a una mayor expresión de estos marcadores proinflamatorios en la grasa visceral adyacente (**Figura 48**). Por último, se analizó la relación entre la expresión de los componentes del inflammasoma con el IMC, así como con los niveles de expresión de los mediadores pro-senescentes en la grasa visceral, con asociaciones directas y significativas en todos los casos (**Figura 48**).

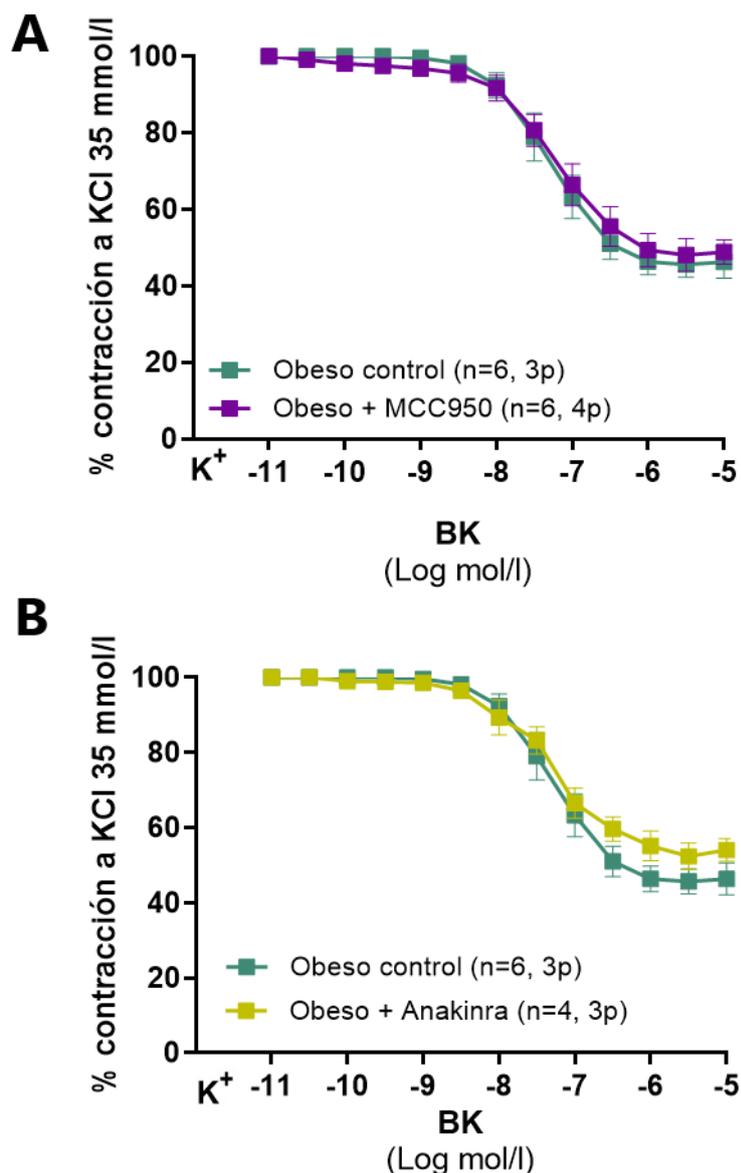


Figura 46. El bloqueo *ex vivo* de la activación del inflamaosma NLRP3 o de su producto IL-1 β no modifica la función endotelial de las microarterias mesentéricas de sujetos obesos. Los microvasos mesentéricos aislados de biopsias de pacientes obesos fueron expuestos a (A) MCC950 (1 μ mol/l) o (B) anakinra (1 μ g/ml), previamente a evaluar la relajación dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de BK. En las curvas se muestran los valores (media \pm EEM) del porcentaje de contracción a KCl 35 mmol/l de todos los segmentos arteriales (n) que provienen de al menos 3 donantes (p) para cada una de las condiciones. (* $p < 0,05$ frente a la curva de los microvasos no tratados, determinado por ANOVA de dos vías).

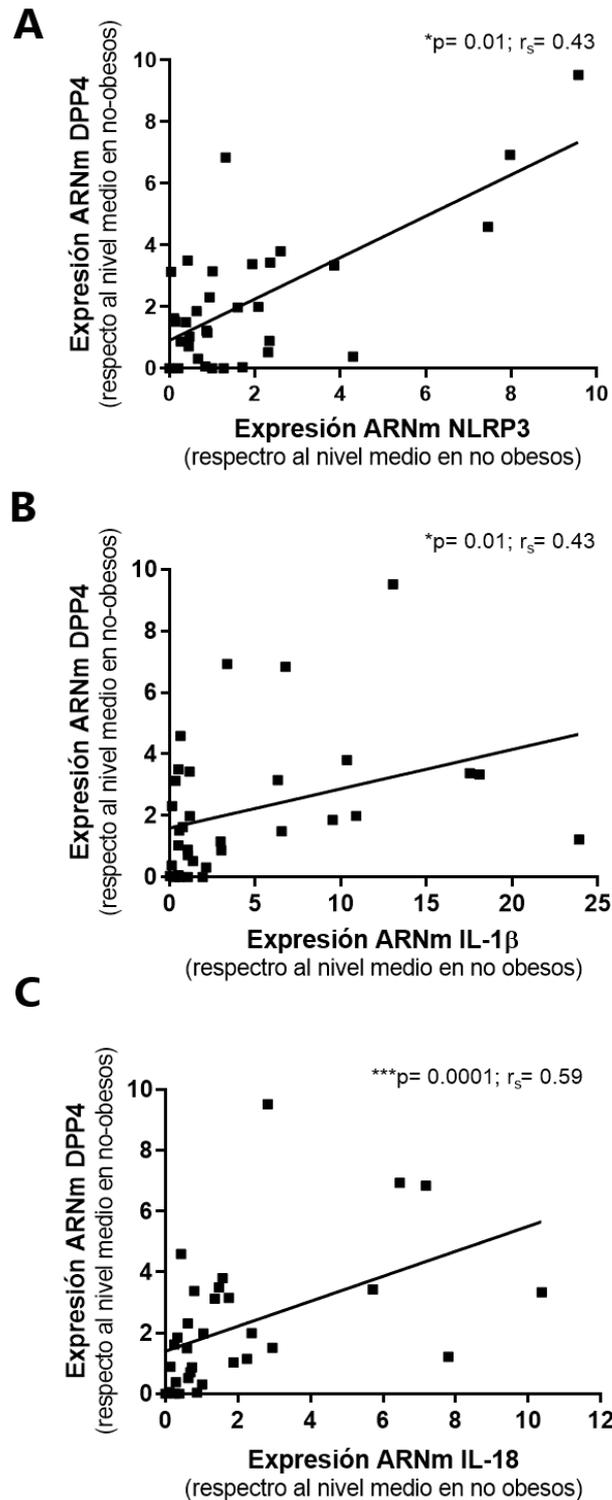


Figura 47. La expresión de DPP4 está asociada positivamente a la expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3 en el tejido adiposo visceral. Se determinó el nivel local de expresión de diversos mediadores en los explantes de grasa visceral obtenidos de sujetos control y pacientes obesos mediante RT-qPCR. Posteriormente se realizó un análisis de correlación lineal entre el nivel de expresión de DPP4 en el tejido adiposo visceral y la expresión de **(A)** NLRP3, **(B)** IL-1 β o **(C)** IL-18. Cada punto representa los datos de un sujeto, como coordenada del valor de expresión relativa de cada pareja de marcadores. La expresión se ha calculado respecto al nivel medio en el grupo control normalizado respecto al nivel de expresión del ARNr 18S. El p-valor calculado y el coeficiente de Spearman (r_s) en cada caso se indican en la parte superior de los gráficos.

Resultados

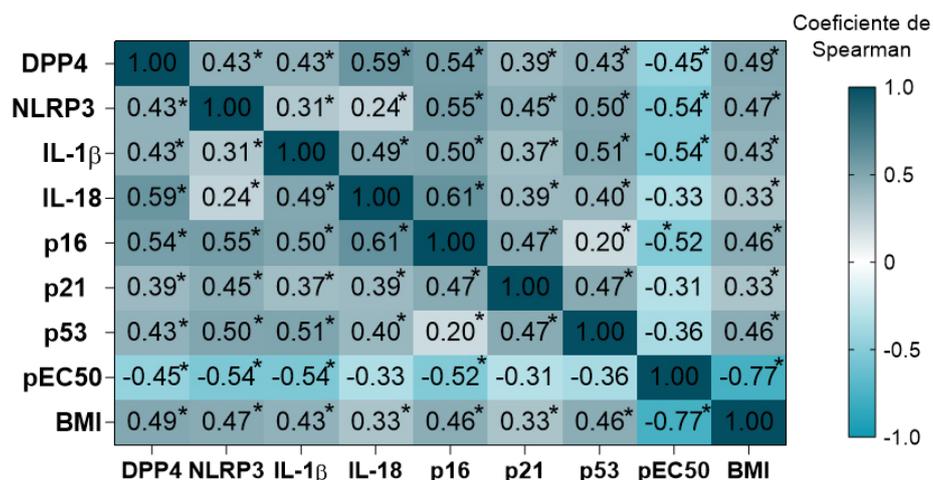


Figura 48. Resumen de la asociación entre las variables estudiadas en la cohorte de sujetos control y pacientes obesos participantes en el estudio. En las coordenadas del mapa de calor se muestran los coeficientes de Spearman calculados en el análisis de correlación lineal entre las variables de cada coordenada. (* $p < 0,05$).

4.5. La inhibición de DPP4 revierte la disfunción endotelial *ex vivo* en las microarterias de pacientes obesos

Finalmente, se determinó el potencial farmacológico de los inhibidores de DPP4 para mejorar el deterioro de la reactividad vascular de los microvasos del grupo de pacientes obesos. Se pre-incubaron los segmentos arteriales con linagliptina (10 nmol/l) durante 30 minutos en ausencia de DPP4, y se procedió al análisis de la relajación dependiente de endotelio en respuesta a BK. Se observó que el tratamiento con linagliptina era capaz de revertir completamente la disfunción endotelial que muestran las arterias de pacientes obesos, alcanzando un nivel de relajación similar al que se observaba en los microvasos del grupo control (**Figura 49**). El valor pEC50 calculado en la respuesta en presencia de linagliptina fue de $8,47 \pm 1,76$.

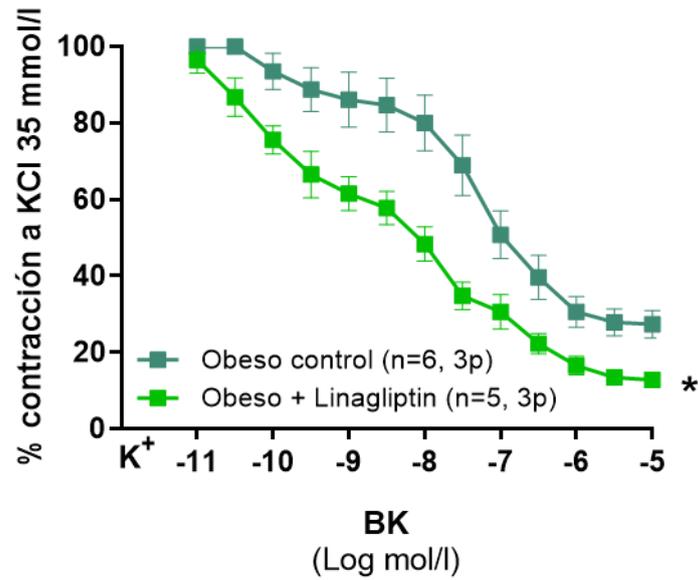


Figura 49. La inhibición de DPP4 revierte la disfunción endotelial ex vivo en las microarterias de pacientes obesos. Los microvasos mesentéricos aislados de biopsias de pacientes obesos fueron tratados con linagliptina (10 nmol/l), previamente a evaluar la relajación dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de BK. En las curvas se muestran los valores (media \pm EEM) del porcentaje de contracción a KCl 35 mmol/l de todos los segmentos arteriales (n) que provienen de al menos 3 donantes (p) para cada una de las condiciones. (* $p < 0,05$ frente a la curva de los microvasos no tratados, determinado por ANOVA de dos vías).

DISCUSIÓN

El envejecimiento vascular acelerado es una característica común que aparece en la mayor parte de las enfermedades asociadas a la edad (Ungvari et al., 2018). De hecho, el deterioro de la función vascular y las propias enfermedades cardiovasculares se consideran ejes impulsores de la fragilidad y discapacidad en la población mayor (Costantino et al., 2016). La diabetes, término empleado para definir la coexistencia de obesidad y diabetes, ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel global, siendo las enfermedades cardiovasculares la principal causa de morbimortalidad en la sociedad actual (Ammirati et al., 2020). Además, la diabetes ha comenzado a considerarse una condición progérica, ya que comparte indicadores biológicos con el proceso de envejecimiento (Salvestrini et al., 2019; Burton y Faragher, 2018; Kalyani et al., 2017; Pérez et al., 2016). Es por ello que hay gran interés en determinar nuevos mecanismos y dianas terapéuticas para abordar y ralentizar el envejecimiento vascular prematuro y así, en una población cada vez más longeva, alcanzar un estado de envejecimiento saludable.

A pesar de que las adipoquinas se han identificado como efectores cruciales de algunos de los cambios estructurales y funcionales que afectan a la vasculatura durante la diabetes (Wronkowitz et al., 2015; Vallejo et al., 2011), su implicación en el proceso de envejecimiento vascular ha sido poco explorado. En este trabajo, se ha determinado en qué medida la adipoquina sDPP4 participa en el proceso de envejecimiento vascular prematuro en la diabetes, que cursa con niveles circulantes de sDPP4 aumentados (Lamers et al., 2011; Sell et al., 2013), asociados además con indicadores de resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Lamers et al., 2011).

Los resultados de esta tesis doctoral han demostrado que la adipoquina sDPP4 es capaz de inducir directamente dos indicadores de envejecimiento vascular, como son la senescencia de células endoteliales humanas en cultivo y la disfunción endotelial en arterias de resistencia humanas. El endotelio es la principal capa celular en la pared de los vasos sanguíneos y controla estrictamente la homeostasis vascular (Deanfield et al., 2007). La acumulación anómala de células endoteliales senescentes altera la funcionalidad endotelial y la capacidad regenerativa del tejido (Erusalimsky y Kurz, 2005). Además, el SASP impulsa el microambiente proinflamatorio, protrombótico y proaterogénico que contribuye a la progresión de la inflamación crónica de bajo grado y a los eventos cardiovasculares más prevalentes durante el envejecimiento (Lagoumtzi y Chondrogianni, 2021). Por lo tanto, comprender cuáles son los mecanismos moleculares que desencadenan la senescencia y disfunción endoteliales es

Discusión

esencial para identificar terapias que retrasen el desarrollo de enfermedades vasculares en la diabetes y el envejecimiento.

Con respecto al estudio de los mecanismos que actúan en el endotelio, los resultados de esta tesis han demostrado que sDPP4 induce senescencia endotelial mediante la activación del receptor PAR2. En el contexto de la diabetes, la actividad de este receptor metabotrópico se ha asociado previamente con la inflamación vascular (Macfarlane et al., 2001). PAR2 controla el tono vascular y la coagulación (Zhao et al., 2014; Sriwai et al., 2013) y su expresión está aumentada en las lesiones ateroscleróticas de arterias coronarias humanas (Napoli et al., 2004; Jones et al., 2018), así como en modelos animales de obesidad inducida por dieta alta en grasa y DMT2 (Indrakusuma et al., 2017; Kagota et al., 2011). De hecho, se ha determinado que tanto la delección genética como el bloqueo farmacológico de PAR2 atenúan el desarrollo de la aterosclerosis en ratones (Jones et al., 2018), lo que lo convierte en una diana interesante para abordar también el envejecimiento vascular. Algunos estudios previos de nuestro grupo habían determinado ya que sDPP4 induce la inflamación y proliferación de CMLVH a través de PAR2 (Indrakusuma et al., 2017; Wronkowitz et al., 2014) y que, en arterias mesentéricas murinas, el bloqueo de PAR2 previene la disfunción endotelial inducida por sDPP4 (Romacho et al., 2016). Los presentes resultados aportan una evidencia más para concluir que PAR2 interviene como uno de los principales receptores por los que sDPP4 ejercería sus funciones pleiotrópicas sobre la pared vascular. En este contexto, cabe destacar el potencial beneficio terapéutico que presentarían las gliptinas al bloquear la interacción entre DPP4 y PAR2. Estudios previos de nuestro grupo han descrito que la actividad proteasa de DPP4 no es necesaria para activar el receptor PAR2 (Wronkowitz et al., 2014). Sin embargo, cuando las gliptinas inhiben la actividad enzimática de DPP4, se unen a una región de su estructura muy cercana a la secuencia por la que DPP4 interacciona con el receptor PAR2 (Arulmozhiraja et al., 2016). Esta secuencia en la molécula de DPP4, denominada SLIG, posee un alto grado de homología con el ligando dentro de PAR2 que necesita unirse al receptor para activarse (Wronkowitz et al., 2014). Por tanto, las gliptinas podrían impedir estéricamente la unión de DPP4 y PAR2, y así bloquear el efecto de DPP4 sobre el endotelio, con el consiguiente beneficio cardiovascular que esto supondría.

Tanto en células de músculo liso vascular como en células endoteliales humanas, la activación de PAR2 se ha asociado intracelularmente al aumento secuencial de la expresión y actividad de COX-2 (Wronkowitz et al., 2014; Indrakusuma et al., 2016; Houlston et al.,

2002). Estos datos concuerdan con el mecanismo molecular que se ha descrito para HUVEC en este trabajo. Nuestros resultados indican que el bloqueo de COX-2 o de los receptores TP, activados por TXA₂ derivado de la actividad COX-2, previene la senescencia inducida por sDPP4 a través de PAR2. Por tanto, TXA₂ podría actuar como el mediador final de los efectos pro-senescentes de sDPP4 en el endotelio. De hecho, en esta tesis se ha observado que TXA₂ también induce directamente senescencia en las células endoteliales, como ya se había descrito en fibroblastos (Chien, C. et al., 2014). TXA₂ es un potente vasoconstrictor liberado por las células endoteliales activadas durante la aterosclerosis, por lo que podría contribuir también al efecto protrombótico que caracteriza al endotelio senescente. En humanos, se ha demostrado que los vasos sanguíneos envejecidos producen cantidades aumentadas de factores contráctiles liberados por COX, que contribuyen al desarrollo temprano de la disfunción endotelial (Félétou et al., 2011; Vanhoutte et al., 2009; Taddei et al., 1997). En línea con estos datos, en este trabajo también se ha demostrado que el bloqueo, tanto de PAR2 como de TP, previene el deterioro en la relajación dependiente de endotelio inducida por sDPP4 en arterias mesentéricas humanas, como ya se había demostrado en arterias de ratón (Romacho et al., 2016). Por todo ello, el eje PAR2-COX-2-TP emerge claramente como un importante mecanismo mediador de los efectos deletéreos inducidos por sDPP4 en el endotelio.

Al igual que la senescencia endotelial, la inflamación crónica de bajo grado se presenta como otro de los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen al avance del envejecimiento vascular acelerado (Ungvari et al., 2018). Así, otra de las hipótesis de este trabajo ha sido que sDPP4 podría servir como señal para activar el inflamasoma NLRP3 y la producción de IL-1 β , que constituyen un mecanismo fundamental que relaciona la inflamación y el envejecimiento (Meyers y Zhu, 2020; Latz y Duewell, 2018). Los resultados obtenidos han demostrado que sDPP4 induce la fase de cebado y la fase de activación del inflamasoma NLRP3, concluyendo además que el eje PAR2-COX-2-TP es necesario para la activación del inflamasoma NLRP3 por sDPP4.

Se ha descrito en la literatura que la sobreactivación del inflamasoma NLRP3 contribuye al avance de las enfermedades vasculares asociadas a la diabetes (Rheinheimer et al., 2017; Patel et al., 2016; De Nardo, 2011), e incluso que su propia autoactivación propaga la senescencia endotelial y el envejecimiento vascular (Romero et al., 2021). En esta línea, en nuestro grupo se ha observado que otras adipoquinas sobreexpresadas en los pacientes

Discusión

obesos y diabéticos pueden activar al inflamasoma NLRP3 de forma local en la pared vascular (Romacho, Valencia et al., 2020), por lo que DPP4 podría representar uno más de los marcadores de daño metabólico que convergen en la activación del inflamasoma NLRP3. De hecho, en esta tesis se ha demostrado que el inflamasoma NLRP3 es otro de los mecanismos que median la senescencia y disfunción endotelial inducidas por sDPP4. El papel fisiológico que cumple DPP4/CD26 a nivel del sistema inmune, participando en la activación de los linfocitos y la presentación de antígenos (Klemann et al., 2016), podrían justificar esta coordinación con el inflamasoma NLRP3, uno de los mediadores fundamentales en la respuesta inmune innata (Sutterwala et al., 2014). En esta línea, se ha descrito que la inhibición de DPP4 en macrófagos humanos puede impedir la activación del inflamasoma NLRP3 en respuesta a ox-LDL (Dai et al., 2014). Por otro lado, un estudio previo ha determinado que la expresión de DPP4 aumenta en la superficie de células endoteliales en respuesta a la estimulación con IL-1 β (Meng et al., 2020), quizás como un mecanismo de amplificación de la señal inflamatoria.

El abordaje farmacológico del inflamasoma NLRP3/IL-1 β es una estrategia prometedora frente a la aterosclerosis. Recientemente, el ensayo clínico CANTOS (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study) demostró que la inhibición de IL-1 β con el anticuerpo monoclonal canakinumab disminuía el riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con DMT2 y alto riesgo cardiovascular (Ridker et al., 2017). Sin embargo, también se han reconocido los potenciales efectos inmunosupresores que supondría el bloqueo total de IL-1 β (Ridker et al., 2017). En el contexto de la diabetes, donde los pacientes obesos y diabéticos presentan un mayor riesgo de infección por cualquier causa (Carey et al., 2018), el bloqueo directo de IL-1 β quizás no sería una estrategia farmacológica de primera elección. Por el contrario, la inhibición indirecta del efecto del inflamasoma NLRP3, por ejemplo, a través de bloquear las señales que lo activan, donde entraría también la adipoquina DPP4, podría suponer una estrategia más segura a largo plazo. En este sentido, hay evidencias que han demostrado la capacidad de los inhibidores de DPP4 para modular la señalización TLR4/NLRP3 *in vitro* (Dai et al., 2014) y la liberación de IL-1 β a nivel del tejido cardiovascular (Birnbaum et al., 2019). También se ha observado que en combinación con metformina, el tratamiento con gliptinas incluso mejora el perfil proinflamatorio de pacientes con DMT2 y enfermedad coronaria, incluyendo una reducción significativa de la IL-1 β plasmática (Younis

et al., 2017). Por tanto, la inhibición de DPP4 aportaría también beneficios frente a la inflamación crónica de bajo grado subyacente al envejecimiento vascular en la diabetes.

Uno de los principales factores implicados en la activación del inflamasoma NLRP3 en el contexto de la aterosclerosis es el estrés oxidativo (Sutterwala et al., 2014). Por su parte, anteriores estudios han descrito la importancia de la activación de la enzima NADPH oxidasa en las complicaciones vasculares de la diabetes (Gray et al., 2013). En este trabajo se exploró la posibilidad de que la producción de ROS sirviera como mediador de los efectos de sDPP4 sobre el endotelio, sirviendo como punto de unión entre la activación del eje PAR2-COX-2-TP y del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, nuestros resultados han demostrado que la actividad NADPH oxidasa, reconocida principal fuente de ROS a nivel endotelial (Incalza et al., 2017), no interviene en el mecanismo inducido por sDPP4. De forma análoga, ya se había observado que el bloqueo con apocinina no modificaba la disfunción endotelial inducida por sDPP4 en arterias de ratón (Romacho et al., 2016).

Por otra parte, se conoce que la actividad COX conlleva la producción colateral de aniones O_2^- y radicales hidroxilo, por lo que esta enzima podría ser también una fuente de ROS que interviene en la activación del inflamasoma NLRP3 y en el daño oxidativo en la senescencia inducida por sDPP4 (Capra et al., 2014). Esto sería consistente con los estudios que evidencian las propiedades antioxidantes de los inhibidores de DPP4 en células endoteliales (Pujadas et al., 2016), o las observaciones sobre la mejora de la respuesta oxidativa a nivel cardiaco en ratas deficientes en DPP4 (Bao et al., 2014). En nuestro caso, aunque no puede descartarse que la producción de ROS conecte el eje PAR2-COX-2-TP con el inflamasoma NLRP3, probablemente a través de la propia activación de NF- κ B, sí que se ha demostrado de nuevo que TXA₂ actúa como mediador final de sDPP4 en este mecanismo. En este trabajo también se ha observado que TXA₂ es capaz *per se* de inducir la expresión y ensamblaje de toda la maquinaria del inflamasoma NLRP3 de forma similar a sDPP4. Un estudio previo ha determinado que la activación del receptor TP en arterias pulmonares de rata induce la activación de canales de K⁺ dependientes de voltaje, causando un flujo de salida de potasio (Hae Young Yoo et al., 2012), que es una de las señales activadoras del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, la secuencia molecular detallada que conectaría la activación del receptor TP y la del inflamasoma NLRP3 no se ha determinado en este trabajo, y requiere un estudio adicional. En cualquier caso, la inhibición farmacológica del ensamblaje del inflamasoma NLRP3 con MCC950 o el antagonismo del receptor de IL-1 con anakinra, previnieron tanto la

Discusión

senescencia endotelial inducida por TXA₂ y sDPP4, así como la disfunción endotelial inducida por sDPP4. Por tanto, un mismo mecanismo molecular, que incluye el eje PAR2-COX-2-TP y la activación del inflammasoma NLRP3, parece mediar ambos efectos de sDPP4 sobre el endotelio, tal y como se resumen en la **Figura 50**.

La relación entre senescencia endotelial y disfunción endotelial se ha evidenciado en un gran número de estudios anteriores (Carracedo et al., 2018). Por ejemplo, se ha descrito que los modelos animales de envejecimiento acelerado, en cuyo tejido vascular se acumulan células senescentes (Onetti et al., 2013; Xiao et al., 2009), presentan una reactividad vascular deteriorada (Novella et al., 2013; Lloréns et al., 2014). No se conoce con exactitud la secuencia de acontecimientos que relacionan la senescencia y la disfunción endotelial, pero se acepta la idea de que el ambiente proinflamatorio y la reducción en la producción de NO por las células endoteliales senescentes, contribuyen al compromiso de la función vascular (Wu et al., 2020).

En este trabajo, para evaluar la relevancia de la implicación de sDPP4 en el contexto patológico de una enfermedad como es la obesidad, se ha contado con muestras procedentes de una cohorte de pacientes obesos y pacientes control. En el grupo de estudio, los pacientes obesos presentaban hiperglucemia e hipertensión en comparación con el grupo de pacientes control. Además, mostraban una relajación dependiente de endotelio significativamente deteriorada. De manera relevante, el bloqueo farmacológico de la actividad de sDPP4 o de los mecanismos de señalización inducidos por sDPP4 revertía la disfunción endotelial de los pacientes obesos hasta niveles similares a los observados en el grupo control. De nuevo, el bloqueo del eje PAR2-COX-2-TP parecía mediar el efecto de DPP4 en el contexto más complejo del tejido humano.

No obstante, se observaron algunas discrepancias en el efecto del bloqueo del inflammasoma NLRP3 en las arterias de pacientes obesos y sujetos control. El bloqueo con MCC950 o con anakinra no revirtió la disfunción endotelial de las arterias de pacientes obesos, contrariamente a lo observado con el bloqueo de los receptores PAR2 y TP. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo han concluido que los productos de la actividad de COX-1 y COX-2, que actúan a través de los receptores TP en la pared vascular, son mediadores principales de la disfunción endotelial, particularmente durante el envejecimiento y en las enfermedades cardiometabólicas (Rodríguez-Manas et al., 2009). Por

tanto, es posible que la activación del inflamasoma NLRP3 sea relevante para los efectos pro-senescentes y proinflamatorios de sDPP4, pero no tanto para el deterioro agudo de la relajación dependiente de endotelio, que sería directamente producida por el eje PAR2-COX-2-TP sin necesidad de activar el inflamasoma. Otra posibilidad es que el inflamasoma NLRP3, ya activado en el tejido adiposo y la vasculatura de los pacientes obesos, no fuera sensible al efecto de los fármacos usados en los experimentos *ex vivo*. De hecho, MCC950 actúa sobre el dominio Walker B en la región NATCH de NLRP3 y evita su unión a ASC y la formación del complejo inflamasoma (Coll et al., 2019; Tapia-Abellán et al., 2019), pero no hay evidencias que demuestren la capacidad del fármaco para frenar la acción de los complejos inflamasoma que ya estuvieran preformados.

La principal característica de la obesidad es la hipertrofia e inflamación del tejido adiposo, que puede influir en las respuestas vasculares a nivel local y sistémico, y contribuir a la enfermedad vascular (Letra y Seiça, 2017; Romacho et al., 2014). Así, un objetivo adicional de este trabajo ha sido analizar si DPP4 estaba afectando a la disfunción vascular de los pacientes obesos por encontrarse sobreexpresada en el entorno adiposo en el que se encontraban las arterias mesentéricas. En primer lugar, en la tesis se ha comprobado que, en el tejido adiposo visceral de los pacientes obesos, los niveles de expresión de DPP4 son significativamente más elevados que en los pacientes control, como se había determinado anteriormente (Sell et al., 2013; Lamers et al., 2011). Además, el perfil de expresión de las biopsias de tejido adiposo en los pacientes obesos demostró todo un microambiente pro-senescente y proinflamatorio, donde la expresión de DPP4 mostró una correlación positiva con la expresión de genes relacionados con la senescencia del tejido adiposo.

DPP4 podría así presentarse como un nuevo marcador del tejido adiposo senescente, cuyo fenotipo podría transmitirse a la pared vascular de las arterias anatómicamente cercanas o incluso al propio árbol vascular dentro del tejido graso. En estudios previos ya se había apuntado a DPP4 como un marcador de senescencia, no como un inductor directo, como sí muestran los resultados de este trabajo. En efecto, la expresión de DPP4 aumenta en cultivos de fibroblastos no proliferativos, así como en la aorta de ratas envejecidas o en los linfocitos de personas de avanzada edad (Kim et al., 2017; Chen et al., 2020). Sin embargo, en este punto se debe considerar una limitación del estudio. Debido a la escasa disponibilidad de tejido humano, en este estudio no ha sido posible demostrar una relación causa-efecto entre el contenido de DPP4 de la grasa visceral, la disfunción endotelial de las microarterias

Discusión

cercanas y la capacidad pro-senescente de DPP4, comprobada únicamente *in vitro*. En cualquier caso, aunque no se ha podido establecer una relación directa entre la senescencia y la disfunción endotelial *in vivo*, los resultados sí que demuestran que la inhibición farmacológica de DPP4, así como de los mecanismos que induce, revierte la disfunción endotelial observada en los pacientes obesos, sin afectar a la función vascular de los pacientes control. Además, se ha podido demostrar que el contexto tisular de las arterias mesentéricas es diferente en el escenario patológico de la obesidad y que una peor función vascular está positivamente asociada con mayor IMC, mayor expresión local de DPP4 y con un ambiente pro-senescente y proinflamatorio de la grasa visceral.

En base a estos datos, y en línea con los resultados obtenidos *in vitro*, es posible que la adipocina sDPP4 en el tejido adiposo visceral pueda inducir directamente senescencia local, que se extendería también a la pared vascular de las arterias en contacto directo con la grasa. Algunos estudios previos han indicado que los explantes de tejido adiposo visceral de pacientes obesos expresan y liberan mayores cantidades de sDPP4 en comparación con sujetos no obesos (Lamers et al., 2011). A pesar de que los factores que regulan la liberación de DPP4 no se conocen totalmente, se ha observado que tanto la insulina como la estimulación con TNF- α pueden aumentar la escisión de la forma soluble hasta en un 50% sin alterar su expresión (Röhrborn et al., 2014). Por tanto, el propio contexto proinflamatorio y pro-senescente del tejido adiposo de los pacientes obesos podría aumentar la producción de sDPP4 y sus efectos directos sobre la pared vascular. Además, la actividad circulante de sDPP4 se ha relacionado anteriormente con un deterioro de la microcirculación epitelial y la dilatación mediada por flujo en pacientes con DMT2 (Barchetta et al., 2019; da Silva Júnior, Wellington Santana et al., 2018). Estas evidencias podrían apuntar al papel de DPP4 como posible biomarcador de envejecimiento vascular en los pacientes obesos y diabéticos. Sin embargo, en esta tesis doctoral no se ha tenido acceso a muestras sanguíneas de los pacientes donde se podría haber analizado la concentración plasmática de DPP4 en relación a los parámetros de función vascular.

Estudios recientes realizados *in vitro* han demostrado que la conexión bidireccional de la grasa y la pared vascular en el denominado eje adiposo-vascular puede inducir la senescencia de ambos tejidos (Parvizi et al., 2021; Barinda et al., 2020). Se sabe que el fenotipo senescente puede propagarse de forma paracrina a través del SASP y otros mediadores circulantes (Acosta et al., 2013), lo que podría explicar la asociación observada entre la acumulación de

adipocitos senescentes y la inflamación crónica de bajo grado y la resistencia a la insulina descritas en la obesidad (Atawaia et al., 2019; Tchkonja et al., 2020). Por otra parte, se ha descrito que la ablación de células senescentes y los tratamientos con fármacos senolíticos reducen las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad en modelos animales (Wang, L. et al., 2022; Sierra-Ramirez et al., 2020; Palmer et al., 2019). Además, un ensayo clínico reciente ha demostrado por primera vez que el tratamiento con senolíticos reduce las células senescentes en el tejido adiposo de pacientes diabéticos con enfermedad renal (Hickson et al., 2019). Por lo tanto, aunque la evidencia de la senescencia del tejido adiposo de pacientes obesos ya se había determinado anteriormente, un hallazgo principal de este trabajo es que se propone a DPP4 como un nuevo factor que conectaría la respuesta senescente desde la grasa al deterioro de la pared vascular.

Como farmacólogos, un objetivo esencial de la tesis doctoral ha sido determinar en qué medida los inhibidores de DPP4 pueden presentar potencial terapéutico para frenar el envejecimiento vascular prematuro. En nuestros experimentos, linagliptina previno la senescencia y la disfunción endotelial inducida por sDPP4 y mejoró la reactividad vascular de los microvasos de pacientes obesos. En trabajos previos se ha descrito la capacidad vasodilatadora de las gliptinas, en todos los casos atribuida a un mecanismo mediado por GLP-1 (Aini et al., 2019; Zhu, Li, Mei et al., 2019), sin evaluar un posible efecto directo de sDPP4 sobre la vasculatura. Sin embargo, en arterias mesentéricas de ratón, nuestro grupo había comprobado anteriormente que el efecto de sDPP4 sobre la función vascular no depende de las incretinas (Romacho et al., 2016). Esto podría ocurrir asimismo con respecto al efecto pro-senescente de DPP4, en línea con otros de sus efectos independientes de incretinas a nivel cardiovascular (Röhrborn et al., 2015), lo que ratificaría la implicación directa de DPP4 como inductor de envejecimiento vascular.

Aunque se ha demostrado que los inhibidores de DPP4 ejercen efectos antiinflamatorios, antiproliferativos e incluso antisenescentes *in vitro* (Bi et al., 2019; Wronkowitz et al., 2014), no hay apenas evidencias sobre sus posibles beneficios *in vivo* en el contexto del envejecimiento. Se ha descrito que el tratamiento con linagliptina decelera la progresión del envejecimiento prematuro en un modelo de ratón (Hasegawa et al., 2017), y que los ratones obesos tratados con inhibidores de DPP4 presentan una mayor esperanza de vida (Zhu, Li, Xiang et al., 2019). En pacientes de avanzada edad con DMT2, con o sin Alzheimer, el tratamiento con gliptinas mejora el deterioro cognitivo (Isik et al., 2017). Además, diversos

Discusión

ensayos clínicos en curso, como el estudio SAVORO, podrán arrojar más luz sobre el efecto de saxagliptina en la preservación de la función arterial en pacientes obesos sin enfermedades cardiovasculares. Por el momento, no hay ensayos clínicos en marcha para dilucidar si las gliptinas pueden reducir los signos de envejecimiento vascular acelerado en humanos. Sin embargo, a la luz de los resultados de este trabajo, la adipoquina sDPP4 emerge como un nuevo efector de envejecimiento vascular acelerado y, por tanto, las gliptinas podrían presentar una herramienta farmacológica prometedora para preservar e incluso mejorar la función endotelial asociada a la diabetes y retrasar el envejecimiento inflamatorio a nivel vascular.

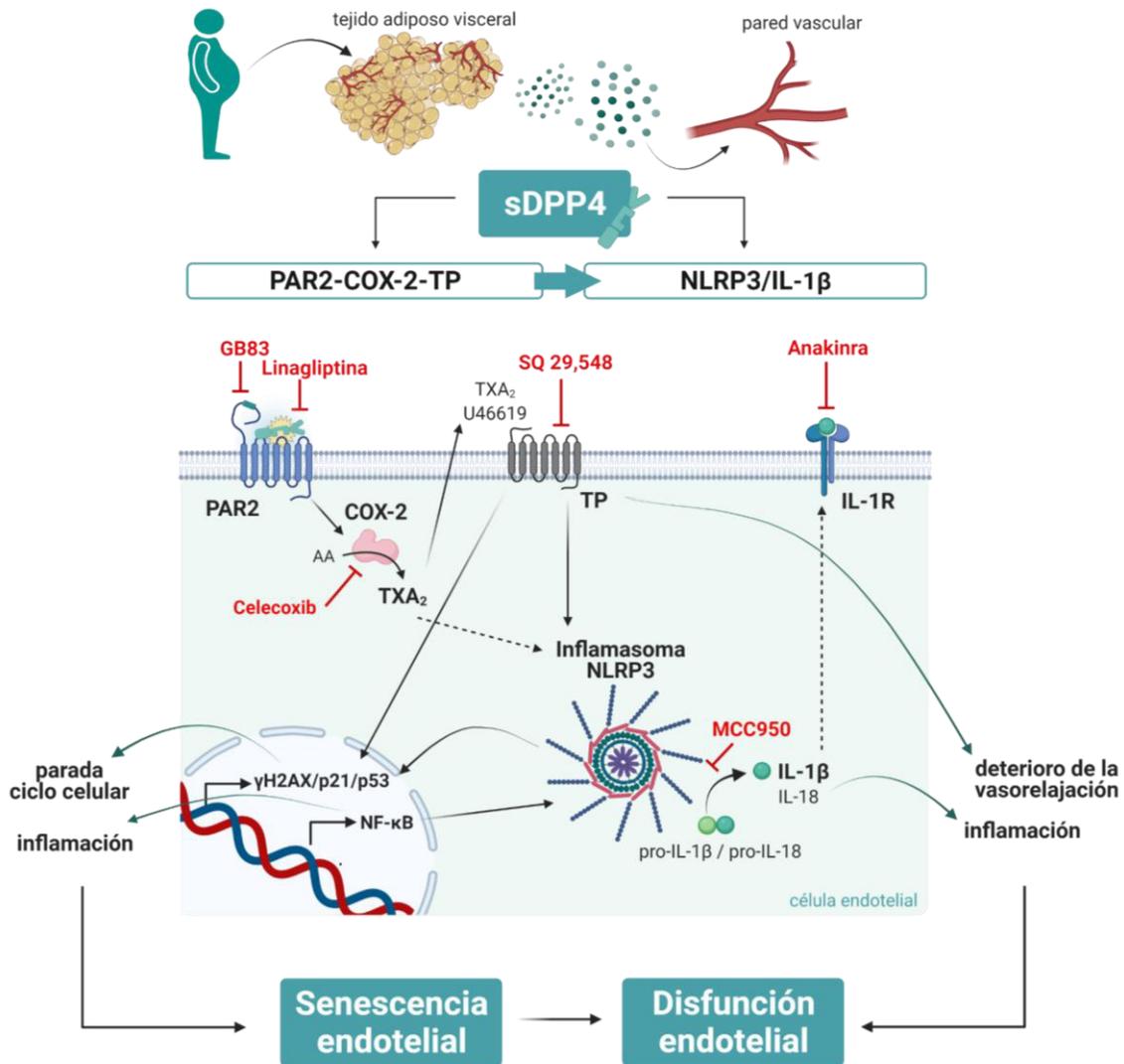


Figura 50. La adipoquina sDPP4 induce senescencia y disfunción endotelial en el contexto de las enfermedades metabólicas. A través de la activación del eje PAR2-COX-2-TP, del inflammasoma NLRP3 y de la producción de IL-1 β , sDPP4 promueve la parada del ciclo celular, deteriora la relajación vascular e induce la expresión de marcadores pro-senescentes y proinflamatorios. En el contexto más complejo del tejido humano, la adipoquina sDPP4 se presenta como un factor relevante que relaciona el estado pro-senescente y proinflamatorio en el tejido adiposo visceral con la disfunción endotelial observada en la obesidad. Los efectos de sDPP4 pueden prevenirse con el uso de fármacos empleados en clínica como los inhibidores de su actividad enzimática (linagliptina), y los fármacos dirigidos frente a IL-1 β (anakinra).

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de este trabajo son:

1. La adipoquina sDPP4 induce senescencia endotelial en células endoteliales humanas en cultivo, causando daño en el ADN y aumento en la expresión de marcadores de arresto del ciclo celular.
2. La adipoquina sDPP4 deteriora la relajación dependiente de endotelio en respuesta a bradiquinina de microarterias de resistencia humanas.
3. La adipoquina sDPP4 sirve como señal para activar el inflamasoma NLRP3 en células endoteliales humanas en cultivo a través del eje PAR2-COX-2-TP.
4. La acción de sDPP4 induciendo senescencia endotelial *in vitro* y disfunción endotelial *ex vivo* está mediada por un mecanismo común que depende de la actividad enzimática de DPP4 y la activación secuencial del eje PAR2-COX-2-TP y del inflamasoma NLRP3.
5. Los pacientes obesos participantes en el estudio presentan una función vascular significativamente deteriorada en comparación con el grupo de sujetos control no obesos. El deterioro de la función de microvasos mesentéricos humanos en los pacientes obesos se asocia positivamente con el índice de masa corporal y la expresión aumentada de DPP4 en el tejido adiposo visceral adyacente.
6. La expresión aumentada de DPP4 a nivel de la grasa visceral de pacientes obesos, se asocia positivamente con un ambiente pro-senescente y proinflamatorio local.
7. La inhibición de DPP4 con linagliptina o el bloqueo del eje PAR2-COX-2-TP revierte la disfunción vascular de las microarterias de pacientes obesos, mientras que el bloqueo del ensamblaje del inflamasoma NLRP3 o el antagonismo del receptor de IL-1 no modifica la reactividad vascular deteriorada en estos pacientes.

CONCLUSIONS

The main conclusions derived from this study are:

1. sDPP4 triggers endothelial senescence in cultured human endothelial cells, inducing DNA damage and the overexpression of cell cycle arrest markers.
2. sDPP4 impairs endothelium-dependent relaxation in response to bradykinin of human isolated resistance microarteries.
3. sDPP4 induce both phases of NLRP3 inflammasome activation in cultured human endothelial cells through activation of PAR2-COX-2-TP axis.
4. sDPP4-induced endothelial senescence *in vitro* and endothelial dysfunction *ex vivo* is mediated by a common molecular pathway involving DPP4 enzymatic activity and the sequential activation of PAR2-COX-2-TP axis and NLRP3 inflammasome machinery.
5. Obese patients in the cohort of study display an impaired vascular function in comparison to control non-obese counterparts. The impaired vascular function of microvessels from obese patients is positively associated with the body mass index and the enhanced expression of DPP4 in the visceral adipose tissue in close proximity.
6. The enhanced expression of DPP4 in the visceral adipose tissue from obese patients is positively associated with a local pro-senescent and pro-inflammatory microenvironment.
7. DPP4 inhibition with linagliptin or pharmacological blockade of PAR2-COX-2-TP axis reverts the vascular dysfunction elicited by the microvessels from obese patients, whereas the blockade of NLRP3 inflammasome assembly or antagonism of IL-1 receptor cannot modify the impaired vascular reactivity in these patients.

REFERENCIAS

- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 15, 978-990. doi: 10.1038/ncb2784.
- Adaikalakoteswari, A., Balasubramanyam, M., Ravikumar, R., Deepa, R., Mohan, V. (2006). Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis.* 195, 83-89. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.003.
- Aini, K., Fukuda, D., Tanaka, K., Higashikuni, Y., Hirata, Y., Yagi, S., et al. (2019). Vildagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Attenuates Endothelial Dysfunction and Atherogenesis in Nondiabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Int Heart J.* 60, 1421-1429. doi: 10.1536/ihj.19-117.
- Ammirati, E., Grundy, S. M., Howard, G., Moran, A. E., Narula, J., Reitsma, M., et al. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *Circulation.* 76, 2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
- Antonopoulos, A. S., Margaritis, M., Lee, R., Channon, K., Antoniades, C. (2012). Statins as Anti-Inflammatory Agents in Atherogenesis: Molecular Mechanisms and Lessons from the Recent Clinical Trials. *Curr Pharma Drugs.* 18, 1519-1530. doi: 10.2174/138161212799504803.
- Arulmozhiraja, S., Matsuo, N., Ishitsubo, E., Okazaki, S., Shimano, H., Tokiwa, H. (2016). Comparative Binding Analysis of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-4) with Antidiabetic Drugs – An Ab Initio Fragment Molecular Orbital Study. *PLoS ONE.* 11(11), e0166275. doi: 10.1371/journal.pone.0166275.
- Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., de Kreutzenberg, S., Fadini, G. P. (2011). Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Hypertension.* 34(2), S285-S290. doi: 10.2337/dc11-s239.
- Bao, W., Morimoto, K., Hasegawa, T., Sasaki, N., Yamashita, T., Hirata, K., et al. (2014). Orally administered dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (alogliptin) prevents abdominal aortic aneurysm formation through an antioxidant effect in rats. *J Vasc Surg.* 59(4), 1098-1108. doi: 10.1016/j.jvs.2013.04.048.
- Barchetta, I., Ciccarelli, G., Barone, E., Cimini, F. A., Ceccarelli, V., Bertocchini, L., et al. (2019). Greater circulating DPP4 activity is associated with impaired flow-mediated dilatation in adults with type 2 diabetes mellitus. *Nutr, Metab & Cardiovasc Dis.* 29, 1087-1094. doi: 10.1016/j.numecd.2019.07.010.
- Barinda, A. J., Ikeda, K., Nugroho, D. B., Wardhana, D. A., Sasaki, N., Honda, S., et al. (2020). Endothelial progeria induces adipose tissue senescence and impairs insulin sensitivity through senescence associated secretory phenotype. *Nat Comm.* 11, 481. doi: 10.1038/s41467-020-14387-w.

Referencias

- Baumeier, C., Schlüter, L., Saussenthaler, S., Laeger, T., Rödiger, M., Alaze, S. A. et al. (2017). Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 6(19), 1254-1263. doi: 10.1016/j.molmet.2017.07.016
- Beilharz, M., De Nardo, D., Latz, E., Franklin, B. S. (2016). Measuring NLR Oligomerization II: Detection of ASC Speck Formation by Confocal Microscopy and Immunofluorescence. Capítulo en *NLR Proteins: Methods and Protocols*. Eds: Di Virilio, F. y Pelegrin, P. *Methods in Mol Biol.* 1417, 145. doi: 10.1007/978-1-4939-3566-6_9.
- Bentzon, J., Otsuka, F., Virmani, R., Falk, E. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res.* 114, 1852-1866. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
- Bhaskaran, K., Dos-Santos-Silva, I., Leon, D. A., Douglas, I. J., Smeeth, L. (2018). Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3.6 million adults in the UK. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 6, 944-953. doi: 10.1016/s2213-8587(18)30288-2.
- Bi, J., Cai, W., Ma, T., Deng, A., Ma, P., Han, Y., et al. (2019). Protective effect of vildagliptin on TNF- α -induced chondrocyte senescence. *IUBMB Life.* 71, 978-985. doi: 10.1002/iub.2049.
- Birnbaum, Y., Tran, D., Bajaj, M., Ye, Y. (2019). DPP-4 inhibition by linagliptin prevents cardiac dysfunction and inflammation by targeting the Nlrp3/ASC inflammasome. *Basic Res Cardiol.* 114(35), 1-22. doi: 10.1007/s00395-019-0743-0.
- Brandt, I., Lambeir, A., Ketelslegers, J., Vanderheyden, M., Scharpé, S., De Meester, I. (2006). Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clin Chem.* 52(1), 82-87. doi: 10.1373/clinchem.2005.057638.
- Brodsky, S. V., Gealekman, O., Chen, J., Zhang, F., Togashi, N., Crabtree, M., et al. (2004). Prevention and Reversal of Premature Endothelial Cell Senescence and Vasculopathy in Obesity-Induced Diabetes by Ebselen. *Circ Res.* 94, 377-384. doi: 10.1161/01.RES.0000111802.09964.EF.
- Burska, A. N., Sakthiswary, R., Sattar, N. (2015). Effects of Tumour Necrosis Factor Antagonists on Insulin Sensitivity/Resistance in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 10(6), e0128889. doi: 10.1371/journal.pone.0128889.
- Burton, D., Faragher, R. (2018). Obesity and type-2 diabetes as inducers of premature cellular senescence and ageing. *Biogerontology.* 19, 447-459. doi: 10.1007/s10522-018-9763-7.
- Campisi, J., d'Adda Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev.* 8, 729-740. doi: 10.1038/nrm2233.

Campisi, J., Kapahi, P., Lithgow, G. J., Melov, S., Newman, J. C., Verdin, E. (2019). From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. 571, 183-192. doi: 10.1038/s41586-019-1365-2.

Capra, V., Bäck, M., Angiolillo, D. J., Cattaneo, M., Sakariassen, K. S. (2014). Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. *J Thromb Haemostas*. 12(1), 126-137. doi: 10.1111/jth.12472.

Carey, I. M., Critchley, J. A., DeWilde, S., Harris, T., Hosking, F. J., Cook, D. G. (2018). Risk of Infection in Type 1 and Type 2 Diabetes Compared With the General Population: A Matched Cohort Study. *Diabetes Care*. 41, 513-521. doi: 10.2337/dc17-2131.

Carracedo, J., Ramírez-Carracedo, R., Altique, M., Ramírez-Chamond, R. (2018). Endothelial Cell Senescence in the Pathogenesis of Endothelial Dysfunction. Capítulo en *Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges*, Eds: Lasi H., IntechOpen.

Cefalu, W. T., Kaul, S., Gerstein, H. C., Holman, R. R., Zinman, B., Syler, J. S., et al. (2018). Cardiovascular Outcomes Trials in Type 2 Diabetes: Where Do We Go From Here? Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care*. 41, 14-31. doi: 10.2337/dci17-0057.

Chadt, A., Scherneck, S., Joost, H. G., Al-Hasani, H. (2018). *Endotext- Comprehensive free online Endocrinology Book*. Eds: South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.

Chang, L., Garcia-Barrio, M., Chen, Y. (2020). Perivascular Adipose Tissue Regulates Vascular Function by Targeting Vascular Smooth Muscle Cells. *Atheros, Thromb and Vasc Dis*. 40, 1094-1109. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.312464.

Chen, Z., Yu, J., Fu, M., Dong, R., Tang, Y., Xiao, J., et al. (2020). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition improves endothelial senescence by activating AMPK/SIRT1/Nrf2 signaling pathway. *Biochem Pharmacol*. 177, 113951. doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.003.

Chien, C., Fan, S., Lin, S., Kuo, C., Yang, C., Yu, T., et al. (2014). Glucagon-like peptide-1 receptor agonist activation ameliorates venous thrombosis-induced arteriovenous fistula failure in chronic kidney disease. *J Thromb Haemostas*. 112(1), 1051-1064. doi: 10.1160/TH14-03-0258.

Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Develop*. 25, 2125-2136. doi: 10.1101/gad.17276711.

Coll, R. C., Hill, J. R., Day, C. J., Zamoshnikova, A., Boucher, D., Massey, N. L., et al. (2019). MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol*. 15, 556. doi: 10.1038/s41589-019-0277-7.

Referencias

Cooper, M. E., Bonnet, F., Oldfield, M., Jandeleit-Dahm, K. (2001). Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J of Hyperten.* 14, 475. doi: 10.1016/s0895-7061(00)01323-6.

Coppé, J., Desprez, P., Krtolica, A., Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Anny Rev Pathol Mech Dis.* 5, 99-118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Corvera, S., Gealekman, O. (2014). Adipose tissue angiogenesis: Impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 1842(3), 463-472. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.06.003.

Costantino, S., Paneni, F., Cosentino, F. (2016). Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *J Physiol.* 594, 2061-2073. doi: 10.1113/JP270538.

Cunha, P. G., Boutouyrie, P., Nilsson, P. M., Laurent, S. (2017). Early Vascular Ageing (EVA): Definitions and Clinical Applicability. *Curr Hyperten Rev.* 13, 8-15. doi: 10.2174/1573402113666170413094319.

da Silva Júnior, Wellington, S., Souza, das Graças Coelho de Souza, M., Nogueira Neto, J. F., Bouskela, E., Kraemer-Aguiar, L. G. (2018). Constitutive DPP4 activity, inflammation, and microvascular reactivity in subjects with excess body weight and without diabetes. *Microvasc Res.* 120, 94-99. doi: 10.1016/j.mvr.2018.07.005.

Dai, Y., Dai, D., Wang, X., Ding, Z., Mehta, J. (2014). DPP4-4 Inhibitors Repress NLRP3 Inflammasome and Interlukin-1beta via GLP-1 Receptor in Macrophages Through Protein Kinase C Pathway. *Cardiovasc Drugs Ther.* 28, 425-432. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.027.

Danesh, J., Wheeler, J. G., Hirschfeld, G. M. (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *New Engl J Med.* 350(14), 1387-1397. doi: 10.1016/j.accreview.2004.04.049.

Day, C. Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. (2007). *Diab Vasc Dis Res.* 4(1), 32-38. doi: 10.3132/dvdr.2007.003.

De Nardo, D., Eicke. (2011). NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 32(8), 373-379. doi: 10.1016/j.it.2011.05.004.

de Santos Machado, V., Valadares, A. L. R., Costa-Paiva, L. H., Osis, M. J., Sousa, M. H., Pinto-Neto, A. M. (2013). Aging, obesity, and multimorbidity in women 50 years or older: a population-based study. *Menopause.* 20(8), 818-824. doi: 10.1097/GME.0b013e31827fdd8c.

Deacon, C. F. (2011). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diab Obes Metab.* 13, 7-18. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01306.x.

Deacon, C. F., Plamboeck, A., Rosenkilde, M. M., de Heer, J., Holst, J. J. (2006). GIP-(3–42) does not antagonize insulinotropic effects of GIP at physiological concentrations. *MA J Physiol Endocrinol Metab.* 291, 468-475. doi: 10.1152/ajpendo.00577.2005.

Deanfield, J. E., Halcox, J. P., Rabelink, T. J. (2007). Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation.* 115, 1285-1295. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.

Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., et al. (1995). A Biomarker that Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA.* 92, 9363-9367. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.

Donato, A. J., Morgan, R. G., Walker, A. E., Lesniewski, L. A. (2015). Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 89, 122-135. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.021.

Duan, L., Rao, X., Xia, C., Rajagopalan, S., Zhong, J. (2017). The regulatory role of DPP4 in atherosclerotic disease. *Cardiovasc diabetol.* 16(76). doi: 10.1186/s12933-017-0558-y.

Dungan, C. M., Peck, B. D., Walton, R. G., Huang, Z., Bamman, M. M., Kern, P. A., et al. (2020). In vivo analysis of γ H2AX+ cells in skeletal muscle from aged and obese humans. *FASEB J.* 34(5), 7018-7035. doi: 10.1096/fj.202000111rr.

El Assar, M., Angulo, J., Vallejo, S., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, C. F., Rodríguez-Mañas, L. (2012). Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front in Physiol.* 3, 132. doi: 10.3389/fphys.2012.00132.

Erusalimsky, J. D. (2009). Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol.* 106, 326-332. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207076.

Erusalimsky, J. D., Kurz, D. J. (2005). Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol.* 40, 634-642. doi: 10.1016/j.exger.2005.04.010.

Fadini, G. P., Ceolotto, G., Pagnin, E., de Kreutzenberg, S., Avogaro, A. (2011). At the crossroads of longevity and metabolism: the metabolic syndrome and lifespan determinant pathways. *Aging Cell.* 10, 10-17. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00642.x.

Fei, Y., Tsoi, M., Cheung, B. M. Y. (2019). Cardiovascular outcomes in trials of new antidiabetic drug classes: a network meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol.* 18(112). doi: 10.1186/s12933-019-0916-z.

Félétou, M., Huang, Y., Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *BJPharmacol.* 164, 894-912. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x.

Referencias

Fisman, E. Z., Tenenbaum, A. (2015). Antidiabetic treatment with gliptins: focus on cardiovascular effects and outcomes. *Cardiovasc Diabetol.* 14(129). doi: 10.1186/s12933-015-0294-0.

Fragkos, M., Jurvansuu, J., Beard, P. (2009). H2AX Is Required for Cell Cycle Arrest via the p53/p21 Pathway. *Mol Cell Biol.* 29, 2828-2840. doi: 10.1128/MCB.01830-08.

Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottavanazi, E., et al. (2000). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann Y Academ Sci.* 908, 244-254. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.

Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., et al. (2018). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med.* 5(51). doi: 10.3389/fmed.2018.00061.

Frasca, D., Blomberg, B. B., Paganelli, R. (2017). Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Front Immunol.* 8, 1745. doi: 10.3389/fimmu.2017.01745.

Ghorpade D. S., Ozcan, L., Zheng, Z., Nicoloso, S. M., Shen, y., Chen E. et al. (2018). Hepatocyte-secreted DPP4 in obesity promotes adipose inflammation and insulin resistance. *Nature.* 555(7698): 673-677. doi: 10.1038/nature26138.

Gielen, A., Hageman, G. J., Antoniou, E. E., Nordfjall, K., Mangino, M., Balasubramanyam, M. et al. (2018). Body mass index is negatively associated with telomere length: a collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *Am J Clin Nutri.* 108: 453-475. doi: 10.1093/ajcn/nqy107

Gillum, M. F., Kotas, M. E., Banks, A. S., Li, Q., Bhanot, S., Olesfy, J. M., et al. (2011). SirT1 Regulates Adipose Tissue Inflammation. *Diabetes.* 60, 3235-3245. doi: 10.2337/db11-0616.

Gray, S. P., Jandeleit-Dahm, K. A., Di Marco, E., Okabe, J., Szyndralewicz, C., Heitz, F., et al. (2013). NADPH oxidase plays a key role in diabetes mellitus accelerated atherosclerosis. *Circulation.* 127, 1888-1902. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.132159.

Gritsenko, A., Green, J. P., Brough, D., Lopez-Castejon, G. (2020). Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases. *Cytok Growth Fact Rev.* 55, 15-25. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.08.003.

Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y., Barbarash, O. (2018). Localization of fat depots and cardiovascular risk. *Lipids Health Dis.* 17:218. doi: 10.1186/s12944-018-0856-8.

Gu, P., Xu, A. (2013). Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 14, 49-58. doi: 10.1007/s11154-012-9230-8.

- Hae Young Yoo, Su Jung Park, Eun-Young Seo, Kyung Sun Park, Jung-A. Han, Kyung Soo Kim, et al. (2012). Role of thromboxane A₂-activated nonselective cation channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302, 307-317. doi: 10.1152/ajpcell.00153.2011.
- Hagita, S., Osaka, M., Shimokado, K., Yoshida, M. (2011). Adipose Inflammation Initiates Recruitment of Leukocytes to Mouse Femoral Artery: Role of Adipo-Vascular Axis in Chronic Inflammation. *PLoS One.* 6, e19871. doi: 10.1371/journal.pone.0019871.
- Han, S. H., Quon, M. J., Kim, J., Koh, K. K. (2007). Adiponectin and Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardio.* 49(5), 531-538. doi: 10.1016/j.jacc.2006.08.061.
- Haneklaus, M., O'Neill, L. A. J. (2015). NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev.* 265, 53-62. doi: 10.1111/imr.12285.
- Hasegawa, Y., Hayashi, K., Takemoto, Y., Cheng, C., Takane, K., Lin, B., et al. (2017). DPP-4 inhibition with linagliptin ameliorates the progression of premature aging in *klotho*^{-/-} mice. *Cardiovasc Diabetol.* 16(154). doi: 10.1186/s12933-017-0639-y.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 37, 614-636. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Heinonen, S., Buzkova, J., Muniandy, M., Kaksonen, R., Ollikainen, M., Ismail, K., et al. (2015). Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. *Diabetes.* 64, 3135-3145. doi: 10.2337/db14-1937.
- Hernández, O., Díaz, L. E., Baccan, G., Gheorge, A., Zapatera, B., Marcos, A., et al. (2013). Fat-rich diet-induced obese mice show premature immunosenescence. *Procc Nutr Soci.* 72(OCE1): E75. doi: 10.1017/S0029665113000773.
- Herranz, N., Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *JCI.* 128(4), 1238-1246. doi: 10.1172/jci95148.
- Hickson, L. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N., Hashmi, S. K., et al. (2019). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine.* 47, 446-456. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.069.
- Houlston, R. A., Keogh, R. J., Sugden, D., Dudhia, J., Carter, T. D., Wheeler-Jones, C. (2002). Protease-activated receptors upregulate cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Thromb Haemostas.* 88(2), 321-328. doi no disponibe.

Referencias

Huang, P. P., Fu, J., Liu, L., Wu, K., Liu, H., Qi, B., et al. (2020). Honokiol antagonizes doxorubicin-induced cardiomyocyte senescence by inhibiting TXNIP-mediated NLRP3 inflammasome activation. *Int J Mol Med*. 45, 186-194. doi: 10.3892/ijmm.2019.4393.

Ide, M., Sonoda, N., Inoue, T., Kimura, S., Minami, Y., Makimura, H., et al. (2020). The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, improves cognitive impairment in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting oxidative stress and microglial activation. *PLoS One*. 15, e0228750. doi: 10.1371/journal.pone.0228750.

Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., Giorgino, F. (2017). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vasc Pharmacol*. 100, 1-19. doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.

Indrakusuma, I., Romacho, T., Eckel, J. (2017). Protease-Activated Receptor 2 Promotes Pro-Atherogenic Effects through Transactivation of the VEGF Receptor 2 in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Pharmacol*. 7:497. doi: 10.3389/fphar.2016.00497.

Isik, A. T., Soysal, P., Yay, A., Usarel, C. (2017). The effects of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, on cognitive functions in elderly diabetic patients with or without Alzheimer's disease. *Diab Res Clin Pract*. 123, 192-198. doi: 10.1016/j.diabres.2016.12.010.

Itahana, K., Campisi, J., Dimri, G. P. (2007). Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence. *Capítulo en Biological Aging: Methods and Protocol*. Eds: Tollefsbol, T. O., Humana Press. doi: 10.1007/978-1-59745-361-5_3.

Jones, S., Mann, A., Conrad, K., Saum, K., Hall, D., McKinney, L., et al. (2018). PAR2 (Protease-Activated Receptor 2) Deficiency Attenuates Atherosclerosis in Mice. *Arteroscler Thromb Vasc Biol*. 38(6), 1271-1282. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310082.

Jurk, D., Wilson, C., Passos, J. F., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., et al. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Comm*. 5, 4172. doi: 10.1038/ncomms5172.

Kagota, S., Chia, E., McGuire, J. J. (2011). Preserved arterial vasodilatation via endothelial protease-activated receptor-2 in obese type 2 diabetic mice. *BJPharmacol*. 164, 358-371. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01356.x.

Kagota, S., Maruyama, K., McGuire, J. J. (2016). Characterization and Functions of Protease-Activated Receptor 2 in Obesity, Diabetes, and Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *BioMed Res Int*. 2016, 3130496-16. doi: 10.1155/2016/3130496.

Kalra, S. (2013). Diabesity. *Rec Adv Endocrinol*. 63(4), 532-534. doi no disponible.

- Kalyani, R. R., Golden, S. H., Cefalu, W. T. (2017). Diabetes and Aging: Unique Considerations and Goals of Care. *Diabetes Care*. 40, 440. doi: 10.2337/dci17-0005.
- Kang, T., Yevesa, T., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 479, 547-551. doi: 10.1038/nature10599.
- Kim, K. M., Noh, J. H., Bodogai, M., Martindale, J. L., Yang, X., Indig, F. E., et al. (2017). Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. *Genes Develop*. 31, 1529-1534. doi: 10.1101/gad.302570.117.
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*. 120, 437-447. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.027.
- Klemann, C., Wagner, L., Stephan, M., Von Hörsten, S. (2016). Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol*. 185, 1-21. doi: 10.1111/cei.12781.
- Kotsis, V., Stabouli, S., Karafillis, I., Nilsson, P. (2011). Early vascular aging and the role of central blood pressure. *Hypertension*. 57, 1847-1853. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834a4d9f.
- Kotwas, A., Karakiewicz, B., Zabielska, P., Wieder-Huszla, S., and Jurczak, A. (2021). Epidemiological factors for type 2 diabetes mellitus: evidence from the Global Burden of Disease. *J Hyperten*. 79(10), 1-110. doi: 10.1186/s13690-021-00632-1.
- Krintus, M., Kozinski, M., Kubica, J., Sypniewska, G. (2014). Critical appraisal of inflammatory markers in cardiovascular risk stratification. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 51, 263-279. doi: 10.3109/10408363.2014.913549.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Develop*. 24, 2463-2479. doi: 10.1101/gad.1971610.
- Kuo, L., Yang, X. L. (2008). H2AX a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*. 22, 305-310. doi no disponible.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 113, 3613-3622. doi no disponible.
- Lagoumtzi, S. M., Chondrogianni, N. (2021). Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Rad Biol Med*. 171, 169-190. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.003.

Referencias

Lamers, D., Famulla, S., Wronkowitz, N., Hartwig, S., Lehr, S., Ouwens, D. M., et al. (2011). Dipeptidyl Peptidase 4 Is a Novel Adipokine Potentially Linking Obesity to the Metabolic Syndrome. *Diabetes*. 60, 1917-1925. doi: 10.2337/db10-1707.

Latz, E., Duwell, P. (2018). NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Seminars Immunol*. 40, 61-73. doi: 10.1016/j.smim.2018.09.001.

Lee, K., Robbins, P. D., Camell, C. D. (2021). Intersection of immunometabolism and immunosenescence during aging. *Curr Opin Pharmacol*. 57, 107-116. doi: 10.1016/j.coph.2021.01.003.

Letra, L., Seíça, R. (2017). *Obesity and Brain Function*. Cham: Springer Int Publish.

Li, D., Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduc Target Therap*. 6, 291. doi: 10.1038/s41392-021-00687-0.

Liesa, M., Shirihaí, O. S. (2013). Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab*. 17, 491-506. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.002.

Lim, J., Iyer, A., Liu, L., Suen, J. Y., Lohman, R., Seow, V., et al. (2013). Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. *FASEB J*. 27, 4757. doi: 10.1096/fj.13-232702.

Lloréns, S., De Mera, Raquel M Melero-Fernandez, Pascual, A., Prieto-Martín, A., Mendizábal, Y., De Cabo, C., et al. (2014). The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. *Biogerontology*. 8, 663-672. doi: 10.1007/s10522-007-9108-4.

Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M., Ruiz, A. F., Kalegari, P., Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation- Cytokine. 117, 15-22. doi: 10.1016/j.cyto.2019.01.013.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*. 153, 1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53, 245-282. doi no disponible.

Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S. J., Kroemer, G. (2019). Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab*. 29, 592-610. doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.018.

- Maresca, F., Palma, V. D., Bevilacqua, M., Uccello, G., Tagliatela, V., Giaquinto, A., et al. (2015). Adipokines, Vascular Wall, and Cardiovascular Disease. *Angiology*. 66, 8-24. doi: 10.1177/0003319713520463.
- Marguet, D., Baggio, L., Kobayashi, T., Bernard, A. M., Pierres, M., Nielsen, P. F., et al. (2000). Enhanced Insulin Secretion and Improved Glucose Tolerance in Mice Lacking CD26. *PNAS*. 97 (12), 6874-6879. doi: 10.1073/pnas.120069197.
- Martinon, F., Tschopp, J. (2002). Inflammatory Caspases: Linking an Intracellular Innate Immune System to Autoinflammatory Diseases. *Cell*. 117, 561-574. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.004.
- McClay, C. M., Maynard, L. A., Sperling, G., Barnes, L. L. (1939). Retarded Growth, Life Span, Ultimate Body Size and Age Changes in the Albino Rat after Feeding Diets Restricted in Calories: Four Figures. *J Nutrition*. 18(1), 1-13. doi: 10.1093/jn/18.1.1.
- McClung, J. A., Naseer, N., Saleem, M., Rossi, G. P., Weiss, M. B., Abraham, N. G., et al. (2005). Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA1c. *Diabetologia*. 48, 345-350. doi: 10.1007/s00125-004-1647-5.
- McGill, H. C., McMahan, C. A., Herderick, E. E., Zieske, A. W., Malcom, G. T., Tracy, R. E., et al. (2002). Obesity Accelerates the Progression of Coronary Atherosclerosis in Young Men. *Circulation*. 105, 2712-2718. doi: 10.1161/01.CIR.0000018121.67607.CE.
- McClean, F. H., Grant, C., Morris, A. C., Horgan, G. W., Polanski, A. J., Allan, K., et al. (2018). Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Sci Rep*. 8, 11976. doi: 10.1038/s41598-018-30265-4.
- Meng, J., Zhang, W., Wang, C., Xiong, S., Wang, Q., Li, H., et al. (2020). The dipeptidyl peptidase (DPP)-4 inhibitor trelagliptin inhibits IL-1 β -induced endothelial inflammation and monocytes attachment. *Int Immunopharmacol*. 89(1), 106996. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106996.
- Meyer, A. A., Kundt, G., Lenschow, U., Schuff-Werner, P., Kienast, W. (2006). Improvement of Early Vascular Changes and Cardiovascular Risk Factors in Obese Children After a Six-Month Exercise Program. *J Am Coll Cardiol*. 48(9), 1865-1870. doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.035.
- Meyers, A. K., Zhu, X. (2020). The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. *Cells*. 9, 1808. doi: 10.3390/cells9081808.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., Komuro, I. (2002). Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis: Role of Telomere in Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 105, 1541-1544. doi: 10.1161/01.CIR.0000013836.85741.17.

Referencias

Napoli, C., De Nigris, F., Wallace, J. L., Tajana, G., De Rosa, G., Sica, V., et al. (2004). Evidence that protease activated receptor 2 expression is enhanced in human coronary atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol.* 57, 513-516. doi: 10.1136/jcp.2003.015156.

Nargis, T., Kumar, K., Ghosh, A. R., Sharma, A., Rudra, D., Sen, D., et al. (2017). KLK5 induces shedding of DPP4 from circulatory Th17 cells in type 2 diabetes. *Mol Metabol.* 6, 1529-1539. doi: 10.1016/j.molmet.2017.09.004.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 384(9945), 766-781. doi: 10.1016/s0140-6736(14)60460-8.

Niculescu, M., Lupu, D. (2011). Nutritional influence on epigenetics and effects on longevity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 14(1), 35-40. doi: 10.1097/MCO.0b013e328340ff7c.

Nilsson, P. M. (2008). Early vascular aging (EVA): consequences and prevention. *Vasc Health Risk Manag.* 4(3), 547-552. doi: 10.2147/VHRM.S1094.

Novella, S., Dantas, A. P., Segarra, G., Vidal-Gómez, X., Mompeón, A., Garabito, M., et al. (2013). Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp Gerontol.* 48(11), 1329-1337. doi: 10.1016/j.exger.2013.08.003.

Obana, N., Takagi, S., Kinouchi, Y., Tokita, Y., Sekikawa, A., Takahashi, S., et al. (2003). Telomere Shortening of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Coronary Disease Patients with Metabolic Disorders. *Int Med.* 42(2), 150-153. doi: 10.2169/internalmedicine.42.150.

Olson, B. (2016). Assays for Determination of Protein Concentration 1. *Curr Protoc Pharmacol.* 1,73. doi: 10.1002/cpph.3.

Onetti, Y., Jiménez-Altayó, F., Heras, M., Vila, E., Dantas, A. P. (2013). Western-type diet induces senescence, modifies vascular function in non-senescence mice and triggers adaptive mechanisms in senescent ones. *Exp Gerontol.* 48, 1410-1419. doi: 10.1016/j.exger.2013.09.004.

Organización Mundial de la Salud. (2020). Década del Envejecimiento Saludable 2020-2030. Via <https://www.who.int/es/initiatives/decade-of-healthy-ageing>. Consultado por última vez 14 de Diciembre 2021.

Organización Mundial de la Salud. (2021a). Diabetes, datos y cifras. Actualizado 10 de Noviembre 2021.

Organización Mundial de la Salud. (2015). Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Consultado por última vez 11 de Enero 2022.

Organización Mundial de la Salud. (2021b). Obesidad y Sobrepeso, datos y cifras. Actualizado 9 de Junio de 2021.

Organización Mundial de la Salud. World health statistics 2019 monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. (2019). Consultado por última vez 11 de Octubre 2021.

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev.* 11, 85-97. doi: 10.1038/nri2921.

Pacher, P., Obrosova, I. G., Mabley, J. G., Szabo, C. (2005). Role of Nitrosative Stress and Peroxynitrite in the Pathogenesis of Diabetic Complications. *Emerging New Therapeutical Strategies* 12, 267-275. doi: 10.2174/0929867053363207.

Palmer, A. K., Xu, M., Zhu, Y., Pirtskhalava, T., Weivoda, M. M., Hachfeld, C. M., et al. (2019). Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell.* 18, e12950. doi: 10.1111/accel.12950.

Parvizi, M., Ryan, Z. C., Ebtehaj, S., Arendt, B. K., Lanza, I. R. (2021). The secretome of senescent preadipocytes influences the phenotype and function of cells of the vascular wall. *BBa Mol Bas Dis.* 1867, 165983. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165983.

Patel, M., Galván-Peña, S., Mills, E. L., Olden, R., Triantafilou, M., Wolf, A. I., et al. (2016). Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol Med.* 23(2): 165-180. doi: 10.1016/j.molmed.2016.12.007.

Pérez, L. M., Pareja-Galeano, H., Sanchis-Gomar, F., Emanuele, E., Lucia, A., Gálvez, B. G. (2016). 'Adipaging': ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. *J Physiol.* 594(12), 3187-3207. doi: 10.1113/jp271691.

Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., et al. (2006). Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Atheros Thromb Vasc Biol.* 26, 968-976. doi: 10.1161/01.ATV.0000216787.85457.f3.

Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., et al. (2021). Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 143, e984-e1010. doi: 10.1161/CIR.0000000000000973.

Prattichizzo, F., De Nigris, V., Mancuso, E., Spiga, R., Giuliani, A., Maccacchione, G., et al. (2018). Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox Biol.* 15, 170-181. doi: 10.1016/j.redox.2017.12.001.

Referencias

Pujadas, G., De Nigris, V., Prattichizzo, F., La Sala, L., Testa, R., Ceriello, A. (2016). The dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor teneligliptin functions as antioxidant on human endothelial cells exposed to chronic hyperglycemia and metabolic high-glucose memory. *Endocrine*. 56, 509-520. doi: 10.1007/s12020-016-1052-0.

Qiang, J. K., Lipscombe, L. L., Lega, I. C. (2020). Association between diabetes, obesity, aging, and cancer: review of recent literature. *Transl Cancer Res TCR*. 9, 5743. doi: 10.21037/tcr.2020.03.14.

Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L., Sánchez-Infantes, D. (2021). White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol*. 192, 114723. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114723.

Rheinheimer, J., de Souza, B. M., Cardoso, N. S., Bauer, A. C., Crispim, D. (2017). Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: a systematic review. *Metabolism*. 74, 1-9. doi: 10.1016/j.metabol.2017.06.002.

Ridker, P. M. (2016). A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol*. 67(6), 1813-1818. doi: 10.1161/01.CIR.103.13.1813.

Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., et al. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New Engl J Med*. 377(12), 1119-1131. doi: 10.1056/NEJMoa1707914.

Rodriguez-Manas, L., El-Assar, M., Vallejo, S., Lopez-Doriga, P., Solis, J., Petidier, R., et al. (2009). Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 8(3), 226-238. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00466.x.

Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA Fragmentation during Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139. *J Biol Chem*. 275(13), 9390-9395. doi: 10.1074/jbc.275.13.9390.

Röhrborn, D., Eckel, J., Sell, H. (2014). Shedding of dipeptidyl peptidase 4 is mediated by metalloproteases and up-regulated by hypoxia in human adipocytes and smooth muscle cells 588, 3870-3877. *FEBS Letters*. 588, 3870-3877. doi: 10.1016/j.febslet.2014.08.029.

Röhrborn, D., Wronkowitz, N., Eckel, J. (2015). DPP4 in diabetes. *Front Immunol*. 6, 386. doi: 10.3389/fimmu.2015.00386.

Romacho, T., Elsen, M., Röhrborn, D., Eckel, J. (2014). Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol*. 210, 733-753. doi: 10.1111/apha.12246.

- Romacho T., Sell, H., Indrakusuma, I., Roehrborn D., Castañeda T. R., Jelenik T. et al. (2020). DPP4 deletion in adipose tissue improves hepatic insulin sensitivity in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 318(5): E590-E599. doi: 10.1152/ajpendo.00323.2019.
- Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., et al. (2020). Visfatin/eNamt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Sci Rep.* 10, 5386. doi: 10.1038/s41598-020-62190-w.
- Romacho, T., Vallejo, S., Villalobos, L. A., Wronkowitz, N., Indrakusuma, I., Sell, H., et al. (2016). Soluble dipeptidyl peptidase-4 induces microvascular endothelial dysfunction through proteinase-activated receptor-2 and thromboxane A2 release. *J Hyperten.* 34, 869-876. doi: 10.1097/HJH.0000000000000886.
- Romero, A., Dongil, P., Valencia, I., Vallejo, S., San Hipólito-Luengo, Á, Díaz-Araya, G., et al. (2021). Pharmacological Blockade of NLRP3 Inflammasome/IL-1 β -Positive Loop Mitigates Endothelial Cell Senescence and Dysfunction. *Aging Dis.* 13(1): 284-297. doi: 10.14336/AD.2021.0617.
- Romero, A., San Hipólito-Luengo, A., Villalobos, L., Vallejo, S., Valencia, I., Michalska, P., et al. (2019). The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging Cell.* e12913. doi: 10.1111/accel.12913.
- Salminen, A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Sign.* 24, 835-845. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.006.
- Salvestrini, V., Sell, C., Lorenzini, A. (2019). Obesity May Accelerate the Aging Process. *Front Endocrinol.* 10, 266. doi: 10.3389/fendo.2019.00266.
- Sattar, N., Rawshani, A., Franzén, S., Rawshani, A., Svensson, A., Rosengren, A., et al. (2019). Age at Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus and Associations With Cardiovascular and Mortality Risks. *Circulation.* 139, 2228-2237. doi: 10.1161/circulationaha.118.037885.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth.* 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schindler, T. H., Cardenas, J., Prior, J. O., Facta, A. D., Kreissl, M. C., Zhang, X., et al. (2006). Relationship Between Increasing Body Weight, Insulin Resistance, Inflammation, Adipocytokine Leptin, and Coronary Circulatory Function. *J Am Coll Cardiol.* 47(6), 1188-1195. doi: 10.1016/j.jacc.2005.10.062.
- Sell, H., Blüher, M., Klöting, N., Schlich, R., Willems, M., Ruppe, F., et al. (2013). Adipose Dipeptidyl Peptidase-4 and Obesity. *Diabetes Care.* 36, 4083-4090. doi: 10.2337/dc13-0496.

Referencias

- Sierra-Ramirez, A., López-Aceituno, J. L., Costa-Machado, L. F., Plaza, A., Barradas, M., Fernandez-Marcos, P. J. (2020). Transient metabolic improvement in obese mice treated with navitoclax or dasatinib/quercetin. *Aging*. 12(12), 11337-11348. doi: 10.18632/aging.103607.
- Sriwai, W., Mahavadi, S., Al-Shboul, O., Grider, J. R., Murthy, K. S. (2013). Distinctive G protein-dependent signaling by protease-activated receptor 2 (PAR2) in smooth muscle: feedback inhibition of RhoA by cAMP-independent PKA. *PLoS One*. 8(6), e66743. doi: 10.1371/journal.pone.0066743.
- Strain, W. D., Paldanius, P. M. (2018). Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovasc Diabetol*. 17, 57. doi: 10.1186/s12933-018-0703-2.
- Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G., Latz, E. (2013). ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. Capítulo en *The Inflammasome: Methods and Protocols*. Eds: De Nardo, C. M., Latz, E. *Meth Mol Biol*. 1040, 91-101. doi: 10.1007/978-1-62703-523-1_8.
- Sutterwala, F. S., Haasken, S., Cassel, S. L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann NY Acad Sci*. 1319(1), 82-95. doi: 10.1111/nyas.12458.
- Swanson, K. V., Deng, M., Ting, N. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 19, 477. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A., and Salvetti, A. (1997). Cyclooxygenase Inhibition Restores Nitric Oxide Activity in Essential Hypertension. *Hypertension*. 29, 274-279. doi: 10.1161/01.HYP.29.1.274.
- Takai, H., Smogorzewska, A., de Lange, T. (2003). DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Current Biol*. 13, 1549-1556. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00542-6.
- Takasaki, K., Iwase, M., Nakajima, T., Ueno, K., Nomoto, Y., Nakanishi, S., et al. (2004). K579, a slow-binding inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, is a long-acting hypoglycemic agent. *Euro J Pharmacol*. 486, 335-342. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.12.029.
- Tapia-Abellán, A., Angosto-Bazarra, D., Martínez-Banaclocha, H., de Torre-Minguela, C., Cerón-Carrasco, J. P., Pérez-Sánchez, H., et al. (2019). MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nat Chem Biol*. 15, 560-564. doi: 10.1038/s41589-019-0278-6.
- Tasdemir, N., Lowe, S. W. (2013). Senescent cells spread the word: non-cell autonomous propagation of cellular senescence. *EMBO J*. 32, 1975-1976. doi: 10.1038/emboj.2013.139.
- Taube, A., Schlich, R., Sell, H., Eckardt, K., Eckel, J. (2012). Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302, 2148-2165. doi: 10.1152/ajpheart.00907.2011.

The European Association for the Study of Obesity. (2021). Obesity Statistics. Via <https://easo.org/>. Consultado por última vez 15 de Octubre de 2021.

Toussaint, O., Medrano, E. E., Von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.* 35, 927. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00180-7.

Ungvari, Z., Tarantini, S., Donato, A. J., Galvan, V., Csiszar, A. (2018). Mechanisms of Vascular Aging. *Circ Res.* 123(7), 849-867. doi: 10.1161/circresaha.118.311378.

Ussher, J. R., Drucker, D. J. (2012). Cardiovascular Biology of the Incretin System. *Endr Rev.* 33(2), 187-215. doi: 10.1210/er.2011-1052.

Vallejo, S., Romacho, T., Angulo, J., Villalobos, L. A., Cercas, E., Leivas, A., et al. (2011). Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *PLoS One.* 6(11), e27299. doi: 10.1371/journal.pone.0027299.

van Deursen, J. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 509, 439-446. doi: 10.1038/nature13193.

Vandanmagsar, B., Youm, Y., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., et al. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 17(2), 179-188. doi: 10.1038/nm.2279.

Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. H. C., Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol.* 196, 193-222. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x.

Villalobos, L., Uryga, A., Romacho, T., Leivas, A., Sánchez-Ferrer, C. F., Erusalimsky, J. D., et al. (2014). Visfatin/Nampt induces telomere damage and senescence in human endothelial cells. *Int J Cardiol.* 175(3), 573-575. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.05.028.

Villaret, A., Galitzky, J., Bouloumie, A., Decaunes, P., Esteve, D., Marques, M., et al. (2010). Adipose Tissue Endothelial Cells From Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence. *Diabetes.* 59, 2755-2763. doi: 10.2337/db10-0398.

Villringer, A. (2014). The Path from Obesity and Hypertension to Dementia. Capítulo en *GeNeDis 2014*. Eds: Vlamos, P., Alexiou, A., Springer International Publishing. *Adv Exp Med.* 821. doi: 10.1007/978-3-319-08939-3_3.

Virdis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S. (2010). Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch – Eur J Physiol.* 459, 1015-1023. doi: 10.1007/s00424-009-0783-7.

Referencias

Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., et al. (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Age Develop.* 128, 662-671. doi: 10.1016/j.mad.2007.09.006.

Wang, C., Hess, C. N., Hiatt, W. R., Goldfine, A. B. (2016). Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Circulation.* 133, 2459-2502. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022194.

Wang, L., Hauenstein, A. V. (2020). The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies. *Mol Asp Med.* 76, 100889. doi: 10.1016/j.mam.2020.100889.

Wang, L., Xu, M., Wang, B., Gasek, N. S., Zhou, Y., Cohn, R. L., et al. (2022). Targeting p21Cip1 highly expressing cells in adipose tissue alleviates insulin resistance in obesity. *Cell Metab.* 34(1), 75-89. doi: 10.1016/j.cmet.2021.11.002.

Werner, N., Nickenig, G. (2006). Influence of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cells: Limitations for Therapy?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 257-266. doi: 10.1161/01.ATV.0000198239.41189.5d.

Williams, R., Karuranga, S., Malanda, B., Saeedi, P., Basit, A., Besançon, S., et al. (2020). Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diab Res Clin Pract.* 162, 108072. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108072.

World Obesity Federation. (2020). Obesity: missing the 2025 targets.

Wronkowitz, N., Görgens, S. W., Romacho, T., Villalobos, L. A., Sánchez-Ferrer, C. F., Peiró, C., et al. (2014). Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor 2. *Bioch Biophys Acta.* 1842, 1613-1621. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.004

Wronkowitz, N., Romacho, T., Sell, H., Eckel, J. (2015). Adipose Tissue Dysfunction and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front Horm Res.* 43, 79-92. doi: 10.1159/000360560.

Wu, C., Zheng, L., Wang, Q., Hu, Y. (2021) The emerging role of cell senescence in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med.* 59(1), 27-38. doi: 10.1515/cclm-2020-0601.

Xiao, X., Wang, Y., Gong, H., Chen, P., Xie, L. (2009). Molecular evidence of senescence in corneal endothelial cells of senescence-accelerated mice. *Mol Vis.* 15, 747-761. doi no disponible.

Ye, J. (2011). Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. *Curr Diab Rep.* 11(3), 203-210. doi: 10.1007/s11892-011-0183-1.

- Yi, H., Kim, S. Y., Kim, J. T., Lee, Y., Moon, J. S., Kim, M. Y., et al. (2019). T-cell senescence contributes to abnormal glucose homeostasis in humans and mice. *Cell Death Dis.* 10, 249. doi: 10.1038/s41419-019-1494-4.
- Yoshida, K., Miki, Y. (2010). The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 101(4), 831-835. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01488.x.
- Youm, Y., Kanneganti, T., Vandanmagsar, B., Zhu, X., Ravussin, A., Adijiang, A., et al. (2012). The NLRP3 Inflammasome Promotes Age-Related Thymic Demise and Immunosenescence. *Cell Rep.* 1(1), 56-68. doi: 10.1016/j.celrep.2011.11.005.
- Younis, A., Eskenazi, D., Goldkorn, R., Leor, J., Naftali-Shani, N., Fisman, E. Z., et al. (2017). The addition of vildagliptin to metformin prevents the elevation of interleukin 1 β in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease: a prospective, randomized, open-label study. *Cardiovasc Diabetol.* 16, 69. doi: 10.1186/s12933-017-0551-5.
- Yu, M., Zhan, X., Yang, Z., Huang, Y. (2021). Measuring the global, regional, and national burden of type 2 diabetes and the attributable risk factors in all 194 countries. *J Diabetes.* 13(1), 613-639. doi: 10.1111/1753-0407.13159.
- Zamboni, M., Nori, N., Brunelli, A., Zoico, E. (2021). How does adipose tissue contribute to inflammaging?. *Exp Gerontol.* 143, 111162. doi: 10.1016/j.exger.2020.111162.
- Zhang, J., Xia, L., Zhang, F., Zhu, D., Xin, C., Wang, H., et al. (2017). A novel mechanism of diabetic vascular endothelial dysfunction: Hypoadiponectinemia-induced NLRP3 inflammasome activation. *Biochim Biophys Acta.* 1863, 1556-1567. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.02.012.
- Zhao, P., Metcalf, M., Bunnett, N. W. (2014). Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol.* 5, 67. doi: 10.3389/fendo.2014.00067.
- Zhong, J., Maiseyeu, A., Davis, S. N., Rajagopalan, S. (2015). DPP4 in cardiometabolic disease: recent insights from the laboratory and clinical trials of DPP4 inhibition. *Circ Res.* 116(8), 1491-1504. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305665.
- Zhong, J., Rao, X., Rajagopalan, S. (2013). An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 226, 305-314. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.012.
- Zhu, B., Li, Y., Mei, W., He, M., Ding, Y., Meng, B., et al. (2019). Alogliptin improves endothelial function by promoting autophagy in perivascular adipose tissue of obese mice through a GLP-1-dependent mechanism. *Vasc Pharmacol.* 115, 55-63. doi: 10.1016/j.vph.2018.11.003.

Referencias

Zhu, B., Li, Y., Xiang, L., Zhang, J., Wang, L., Guo, B., et al. (2019). Alogliptin improves survival and health of mice on a high-fat diet. *Aging Cell*. 18, e12883-n/a. doi: 10.1111/accel.12883.

Zimmet, P. Z. (2017). Diabetes and its drivers: the largest epidemic in human history? *Clin Diab Endocrinol*. 3, 1. doi: 10.1186/s40842-016-0039-3.

ANEXOS

Anexo 1

Valores medios de pEC50 calculados en respuesta a la relajación con BK de las arterias mesentéricas aisladas de biopsias de omento del grupo de sujetos control y pacientes obesos en respuesta a los tratamientos indicados. *p≤0,05 frente al valor del grupo control no tratado; #p≤0,05 frente al tratamiento con sDPP4 en el grupo control; \$p≤0,05 frente al valor del grupo de obesos no tratado, determinado por ANOVA de una vía. n: número de segmentos arteriales, p: número de pacientes.

VALORES MEDIOS DE pEC50 CALCULADOS EN RESPUESTA A BRADIQUININA																		
Segmentos arteriales del grupo de sujetos control											Segmentos arteriales del grupo de pacientes obesos							
	sDPP4 200 ng/ml <i>ex vivo</i>						Linagliptina 10 nmol/l	GB83 10 µmol/l	SQ 29,548 10 µmol/l	MCC950 1 µmol/l	Anakinra 1 µg/ml	Control	Linagliptina 10 nmol/l	GB83 10 µmol/l	SQ 29,548 10 µmol/l	MCC950 1 µmol/l	Anakinra 1 µg/ml	
	Control	-	Linagliptina 10 nmol/l	GB83 10 µmol/l	SQ 29,548 10 µmol/l	MCC950 1 µmol/l												Anakinra 1 µg/ml
Media	7,52	5,88 *	7,44 #	7,57 #	7,61 #	7,92 #	7,22 #	7,5 #	7,93 #	7,8 #	7,55 #	7,80	6,10 *	8,30 \$	7,54 \$	7,15 \$	5,63	5,35
EEM	0,17	0,19	0,29	0,22	0,18	0,46	0,27	0,45	0,14	0,20	0,45		0,16	0,35	0,23	0,34	0,33	0,35
n	29	20	5	11	8	6	5	5	4	3	2	1	27	5	11	8	6	4
p	13	13	3	6	5	4	3	3	4	3	1	1	12	3	5	4	4	3

Anexo 2

Valores medios de contracción máxima (mN) alcanzados en respuesta a 35 mmol/l KCl de las arterias mesentéricas aisladas de biopsias de omento del grupo de sujetos control y pacientes obesos en respuesta a los tratamientos indicados. n: número de segmentos arteriales, p: número de pacientes.

VALORES MEDIOS DE CONTRACCIÓN MÁXIMA (mN) EN RESPUESTA A KCl																		
Segmentos arteriales del grupo de sujetos control												Segmentos arteriales del grupo de pacientes obesos						
Control	sDPP4 200 ng/ml <i>ex vivo</i>						Linagliptina 10 nmol/l	GB83 10 µmol/l	SQ 29,548 10 µmol/l	MCC950 1 µmol/l	Anakinra 1 µg/ml	Control	Linagliptina 10 nmol/l	GB83 10 µmol/l	SQ 29,548 10 µmol/l	MCC950 1 µmol/l	Anakinra 1 µg/ml	
	-	Linagliptina 10 nmol/l	GB83 10 µmol/l	SQ 29,548 10 µmol/l	MCC950 1 µmol/l	Anakinra 1 µg/ml												
Media	8,68	9,05	11,99	9,44	10,94	3,59	5,82	11,09	10,57	11,94	7,12	10,17	9,55	8,47	7,25	10,54	9,78	11,74
EEM	0,81	0,91	2,33	1,27	0,76	0,88	1,18	2,85	1,75	0,81	0,94	-	0,89	1,78	1,14	1,26	1,17	1,46
n	29	20	5	11	8	6	5	5	4	3	2	1	27	5	11	8	6	4
p	13	13	3	6	5	4	3	3	4	3	1	1	12	3	5	4	4	3