

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



Universidad Autónoma  
de Madrid

**VISFATINA/NAMPT Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL *IN VIVO*:  
MECANISMOS IMPLICADOS Y MODULACIÓN FARMACOLÓGICA**

Memoria para optar al grado de  
Doctor en Farmacología y Fisiología  
Presentada por

**MARIELLA RAMOS GONZALEZ**

Directores

**Dr. Carlos Félix Sánchez Ferrer**  
Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

**Dra. Concepción Peiró Vallejo**  
Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

**MADRID, 2019**

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
ABREVIATURAS .....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1. EL ENDOTELIO VASCULAR .....	9
1.2. PAPEL FISIOLÓGICO DEL NO .....	11
1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL .....	12
1.4. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL .....	13
1.4.1 Estrés oxidativo .....	13
1.4.2 NADPH oxidasa .....	14
1.4.3 Papel de las enzimas antioxidantes .....	16
1.4.4 Inflamación vascular .....	17
1.4.4.1. Señalización de NF- $\kappa$ B .....	17
1.4.4.1.1. Regulación molecular de la señalización de NF- $\kappa$ B .....	18
1.4.4.1.2. Regulación de NF- $\kappa$ B translocado al núcleo .....	20
1.4.4.2. Inflamasoma NLRP3 .....	21
1.4.4.2.1 NF- $\kappa$ B en la regulación del inflamasoma .....	23
1.4.4.3 Marcadores y citoquinas inflamatorias .....	23

1.5. ENFERMEDADES CARDIOMETABÓLICAS .....	25
1.5.1. Obesidad .....	25
1.5.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) .....	25
1.6. ADIPOQUINAS .....	26
1.6.1. Papel de la IL-1 $\beta$ en obesidad .....	27
1.6.2. Papel de IL-1 $\beta$ en diabetes mellitus .....	27
1.6.3. Papel de la IL-1 $\beta$ en aterosclerosis .....	28
1.7. LA ADIPOQUINA VISFATINA/NAMPT .....	28
1.7.1. El gen y la proteína Nampt .....	30
1.7.2. Mecanismos de secreción de visfatina/Nampt .....	30
1.7.2.1. iNampt .....	30
1.7.2.2. eNampt .....	31
1.7.3. Nampt y la biosíntesis de NAD <sup>+</sup> .....	32
1.7.4. Posible implicancia del TLR4 en la activación de visfatina/Nampt .....	32
1.7.4.1. Visfatina/Nampt en obesidad .....	33
1.7.4.2. Visfatina/Nampt en diabetes mellitus .....	34
1.7.4.3. Visfatina/Nampt en la aterosclerosis .....	34
1.8. PERSPECTIVAS DE INTERFERENCIA FARMACOLÓGICA .....	35
1.8.1 Agente antioxidante: Apocinina .....	35

1.8.2	Antagonista del receptor TP: SQ 29,548 .....	36
1.8.3	Inhibidor del inflamasoma NLRP3: MCC950 .....	37
1.8.4	Antagonista del receptor IL-1: Anakinra .....	38
1.8.5	Inhibidor de visfatina/Nampt: FK866 .....	39
1.8.6	Inhibidor de la señalización de TLR: CLI-095 .....	40
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	42
2.1	HIPÓTESIS .....	43
2.2	OBJETIVO GENERAL .....	43
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
3.1.	DECLARACIÓN DE ÉTICA .....	46
3.2.	CÉLULAS HUMANAS .....	46
3.2.1.	Obtención de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	46
3.2.2.	Caracterización celular .....	48
3.2.2.1.	Inmunofluorescencia indirecta .....	48
3.2.3.	Western blot .....	49
3.2.3.1.	Extracción y cuantificación de proteínas .....	49
3.2.3.2.	Electroforesis y transferencia de proteínas .....	49
3.2.3.3.	Incubación de anticuerpos .....	50

3.2.3.4. Revelado de membrana .....	51
3.3. ANIMALES .....	51
3.3.1. Grupos de animales .....	51
3.3.2. Registros de peso, glucemia y presión arterial por pletismografía de la cola .....	53
3.3.3. Implantación de mini-bombas osmóticas .....	54
3.3.4. Administración vía intraperitoneal .....	55
3.3.5. Toma de muestras .....	55
3.3.6. Reactividad vascular .....	55
3.3.6.1. Segmentos arteriales procedentes de animales controles .....	56
3.3.6.2. Segmentos arteriales procedentes de animales infundidos (mediante mini-bombas o administración intraperitoneal) .....	57
3.3.7. Western blot .....	57
3.3.7.1. Extracción de proteínas de aortas .....	57
3.3.7.2. Cuantificación de proteínas por el método de BCA .....	57
3.3.7.3. Electroforesis y transferencia de proteínas .....	58
3.3.7.4. Incubación de anticuerpos .....	58
3.3.7.5. Revelado de membrana .....	59
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	59
3.5. MATERIALES .....	59
3.5.1. Equipos de laboratorio .....	59

3.5.2.	Programas para ordenadores .....	60
3.5.3.	Materiales .....	60
3.5.4.	Reactivos .....	60
4.	RESULTADOS .....	64
4.1	DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN MICROVASOS MESENTÉRICOS DE RATÓN PRODUCIDA POR VISFATINA/NAMPT .....	65
4.1.1	La administración de visfatina/Nampt <i>ex vivo</i> interfiere con las relajaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados de ratones controles a través de su actividad enzimática Nampt y de otros mediadores, como ROS y prostanoïdes vasoconstrictores ...	65
4.1.2	La administración de visfatina/Nampt en ratones mediante infusión <i>in vivo</i> con mini-bombas osmóticas interfiere con las relajaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados, a través de su actividad enzimática Nampt y de otros mediadores, como ROS y prostanoïdes vasoconstrictores .....	68
4.1.3	Visfatina/Nampt y NMN, el producto de la actividad Nampt, producen deterioro en las relajaciones vasculares inducidas por ACh en arterias mesentéricas de ratones a través de la activación del receptor TLR4 ...	71
4.2	ACTIVACIÓN DE VÍAS PRO-INFLAMATORIAS PRODUCIDA POR VISFATINA/NAMPT EN HUVEC CULTIVADAS .....	73
4.2.1	El tratamiento de HUVEC cultivadas con visfatina/Nampt induce la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión del inflamasoma NLRP3, así como de pro-IL-1 $\beta$ .....	73

4.3	ACTIVACIÓN DE VÍAS PRO-INFLAMATORIAS EN LA PARED VASCULAR AÓRTICA DE RATONES INFUNDIDOS CON VISFATINA/NAMPT .....	77
4.3.1	La administración de visfatina/Nampt en ratones mediante infusión <i>in vivo</i> con mini-bombas osmóticas induce la expresión de p-p65 y el inflammasoma NLRP3 en la pared aórtica .....	77
4.4	PARTICIPACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDUCIDA POR VISFATINA/NAMPT EN MICROVASOS MESENTÉRICOS DE RATÓN .....	78
4.4.1	La administración intraperitoneal de MCC950 previene la disfunción endotelial producida por la infusión <i>in vivo</i> de visfatina/Nampt, mientras que la incubación de los segmentos arteriales con MCC950 no modifica los efectos <i>ex vivo</i> de la adipoquina .....	78
4.4.2	La administración intraperitoneal de anakinra previene la disfunción endotelial producida por la infusión <i>in vivo</i> de visfatina/Nampt, mientras que la incubación de los segmentos arteriales con anakinra no modifica los efectos <i>ex vivo</i> de la adipoquina .....	80
4.4.3	Tanto la incubación de los segmentos arteriales con anakinra como su administración intraperitoneal previene la disfunción endotelial producida por IL-1 $\beta$ <i>ex vivo</i> o <i>in vivo</i> .....	82
5.	DISCUSIÓN .....	88
6.	CONCLUSIONES .....	95
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97



## FIGURAS

- Figura 1.** Funciones del endotelio
- Figura 2.** Isoformas de la NOS. **A.** Producción de NO. **B.** Efectos de NO producidos por las isoformas de NOS.
- Figura 3.** Enzimas Nox en la vasculatura
- Figura 4.** Señalización de NF-κB
- Figura 5.** Esquema de la activación del inflamasoma NLRP3 en la célula endotelial
- Figura 6.** Ensamblaje del inflamasoma NLRP3
- Figura 7.** Efectos autocrinos y paracrinos de eNampt procedentes de las células endoteliales y las células inmunes
- Figura 8.** Vías de biosíntesis de NAD<sup>+</sup> en mamíferos
- Figura 9.** Extracción de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano. **A.** Parte del procedimiento de lavados con PBS de la vena umbilical humana. **B.** Incubación con colagenasa tipo II introducida en la luz del cordón umbilical.
- Figura 10.** Diagrama de los fármacos incubados en las arterias mesentéricas procedentes de ratones controles para los estudios de reactividad vascular.
- Figura 11.** Diagrama de los grupos de tratamientos para los estudios de reactividad vascular a través de bombas osmóticas o dosis inyectables vía peritoneal; entre paréntesis se indica el número de animales utilizados para cada estudio
- Figura 12.** Esquema del protocolo utilizado en la reactividad vascular de vasos pequeños.
- Figura 13.** La administración de visfatina/Nampt *ex vivo* interfiere con las relajaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados de ratones controles a través de su actividad enzimática Nampt.
- Figura 14.** El tratamiento *ex vivo* con apocinina o SQ 29,548 revierte la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt en microvasos mesentéricos de ratón.
- Figure 15.** La infusión *in vivo* de visfatina/Nampt en ratones mediante mini-bombas osmóticas interfiere con las relajaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados a través de su actividad enzimática Nampt.
- Figure 16.** El tratamiento *ex vivo* con apocinina o SQ 29,548 revierte la disfunción endotelial inducida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt.
- Figure 17.** El tratamiento con CLI-095, tanto *ex vivo* como *in vivo*, previene la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt o mononucleótido de nicotinamida (NMN), el producto de la actividad enzimática Nampt.
- Figura 18.** Expresión de p-p65, NLRP3, pro-IL-1β e IL-1β madura en HUVEC tratadas con visfatina/Nampt.
- Figura 19.** Expresión de p-p65, NLRP3 y pro-IL-1β en HUVEC tratadas con NMN.
- Figura 20.** Efecto de FK866, CLI-095 y MCC950 sobre la expresión de p-p65, NLRP3 y pro-IL-1β inducidos por visfatina/Nampt.

- Figura 21.** Expresión de p-p65 y NLRP3 en la pared aórtica de animales infundidos con visfatina/Nampt.
- Figura 22.** El tratamiento con MCC950 previene la disfunción endotelial inducida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt mientras que no modifica los efectos de su administración *ex vivo*.
- Figura 23.** El tratamiento con anakinra previene la disfunción endotelial inducida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt mientras que no modifica los efectos de su administración *ex vivo*.
- Figura 24.** La administración de IL-1 $\beta$ , tanto *ex vivo* como *in vivo*, produce disfunción endotelial que es antagonizada por anakinra.

## TABLAS

- Tabla 1.** Características del anticuerpo primario y secundario utilizados para la inmunofluorescencia indirecta y sus condiciones de uso, en lisados de cultivos celulares de HUVEC.
- Tabla 2.** Características de los anticuerpos primarios utilizados y sus condiciones de uso en lisados de cultivos celulares de HUVEC.
- Tabla 3.** Características de los anticuerpos secundarios utilizados, bloqueos y condiciones de uso en lisados de cultivos celulares de HUVEC.
- Tabla 4.** Dosis administradas de fármacos a través de bombas mini-osmóticas o inyectables intraperitoneales.
- Tabla 5.** Parámetros: peso vivo, glucosa y presión arterial de los animales controles y tratados.
- Tabla 6.** Características de los anticuerpos primarios utilizados y sus condiciones de uso en lisados de aortas.
- Tabla 7.** Características de los anticuerpos secundarios utilizados y sus condiciones de uso en lisados de aortas.

## RESUMEN

La visfatina/Nampt es una proteína pleiotrópica que puede actuar como factor de crecimiento, citoquina o con actividad enzimática nicotinamida fosforibosiltransferasa (Nampt). Es asimismo una adipoquina secretada por el tejido adiposo cuyos niveles plasmáticos se incrementan durante enfermedades cardiometabólicas como la obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Además, esta adipoquina tiene un efecto deletéreo vascular en diversas especies, que incluye inflamación y disfunción endotelial. La hipótesis de trabajo es que, en ausencia de cualquier otra situación fisiopatológica, la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt en ratones puede inducir directamente disfunción endotelial e inflamación vascular similares a las observadas en modelos de diabetes mellitus u obesidad.

Ratones C57BL/6 de cuatro meses de edad recibieron durante siete días mediante mini-bombas osmóticas la infusión de suero salino, visfatina/Nampt (100 ng/kg/día), y/o un inhibidor específico de la actividad Nampt (FK866, 2,4 mg/kg/día). Algunos animales recibieron también un bloqueante de los receptores TLR4 (CLI-095, 3 mg/kg/día), un inhibidor del ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (MCC950, 10 mg/kg los días 2, 4 y 6) o un antagonista de los receptores para IL-1 (anakinra, 100 mg/kg los días 4, 5 y 6). Tras el sacrificio, las respuestas vasodilatadores dependientes e independientes de endotelio a acetilcolina (ACh; 0,1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L) o nitroprusiato sódico (SNP; 1 nmol/L a 100  $\mu$ mol/L), respectivamente, se estudiaron en microvasos mesentéricos aislados. También se realizaron estudios *ex vivo* con visfatina/Nampt (50 ng/mL) o mononucleótido de nicotinamida (NMN, 10  $\mu$ mol/L), junto a concentraciones apropiadas de los antagonistas descritos (FK866, 10  $\mu$ mol/L; CLI-095, 1  $\mu$ mol/L; MCC950, 100 nmol/L; y anakinra, 100  $\mu$ g/mL) en microvasos mesentéricos obtenidos de ratones C57BL/6 sin ningún tipo de tratamiento. A partir de lisados de aortas procedentes de ratones infundidos con visfatina/Nampt, se analizaron las proteínas p65 fosforilada (p-p65), un indicador de la activación de NF- $\kappa$ B, la enzima pro-inflamatoria iNOS y el inflammasoma NLRP3. De forma similar, los cultivos de células umbilicales humanas cultivadas (HUVEC) fueron expuestos a visfatina/Nampt (25, 50 y 100 ng/mL) para analizar sus efectos en la expresión de la proteína p-p65, así como del inflammasoma NLRP3 y la pro-IL-1 $\beta$ , tanto en presencia como en ausencia de FK866 (10  $\mu$ mol/L), CLI-095 (1  $\mu$ mol/L) o MCC950 (1  $\mu$ mol/L).

Los resultados de nuestro trabajo indican que los microvasos mesentéricos obtenidos de ratones infundidos con visfatina/Nampt presentaban disfunción endotelial, con una disminución de las respuestas vasodilatadoras a ACh, pero sin modificación alguna en las inducidas por SNP. Asimismo, se observó un aumento de los marcadores pro-inflamatorios aórticos. La disfunción endotelial se abolió en los animales que recibieron también FK866, CLI-095, MCC950 o anakinra. La administración de visfatina/Nampt *ex vivo* produjo disfunción endotelial que se revertía por FK866 y CLI-095, pero no por MCC950 o anakinra. En las HUVEC cultivadas, visfatina/Nampt incrementó la expresión de p-p65, el inflammasoma NLRP3 y la pro-IL-1 $\beta$ ; siendo la expresión de NLRP3 antagonizada por FK966 y CLI-095. La confirmación del papel del inflammasoma en la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt se obtuvo con el bloqueo de los receptores IL-1 por anakinra que antagonizó el efecto *in vivo* de visfatina/Nampt, lo que sugería que el efector último del daño vascular era la secreción tisular de IL-1 $\beta$  producto final de la activación del inflammasoma.

En conclusión, la infusión de visfatina/Nampt produce disfunción endotelial *in vivo*, corroborando su posible papel como mediador del daño vascular asociado a enfermedades cardiometabólicas descrito anteriormente. Además, esta adipoquina parece tener varios mecanismos celulares y moleculares involucrados, incluyendo su actividad enzimática Nampt y la activación del receptor TLR4 mediante la síntesis de NMN, su producto enzimático. Asimismo, se activan vías inflamatorias, como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 y la secreción de la forma madura de IL-1 $\beta$  de forma paracrina. Es interesante que el daño vascular producido por visfatina/Nampt se previene con CLI-095 y anakinra. Por lo tanto, dianas como los receptores del tipo TLR4 o IL-1 son dianas terapéuticas estratégicas para prevenir las complicaciones vasculares de las enfermedades cardiometabólicas.

## **ABSTRACT**

Visfatin/Nampt is a pleiotropic protein acting as growth factor, cytokine, or enzymatic activity nicotinamide phosphoryltransferase (Nampt). It is also an adipokine secreted by adipose tissue whose expression and release are enhanced in obesity and type 2 diabetes mellitus. Visfatin/Nampt is producing vascular deleterious effects by promoting inflammation and endothelial dysfunction. We hypothesize that, in the absence of any other pathophysiological condition, the *in vivo* infusion of visfatin/Nampt in mice can directly induce vascular inflammation and endothelial dysfunction similar to those observed in models of diabetes mellitus or obesity.

4-month-old C57BL/6 mice were exposed for 7 days to osmotic mini-pump infusion of saline, visfatin/Nampt (100 ng/kg/day), and / or an specific Nampt inhibitor (FK866, 2.4 mg/kg/day). Some animals also received a blocker of TLR4 receptors (CLI-095, 3 mg/kg/day), an inhibitor of NLRP3 inflammasome expression (MCC950, 10 mg/kg on days 2, 4, and 6), or an IL-1-receptor antagonist (anakinra, 100 mg/kg on days 4, 5, and 6). After end-point, endothelium-dependent and independent relaxations to acetylcholine (ACh; 0,1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L) or sodium nitroprusside (SNP; 1 nmol/L to 100  $\mu$ mol/L), respectively, were studied in isolated mesenteric microvessels. Studies *ex vivo* with visfatina/Nampt (25, 50 y 100 ng/mL) or nicotinamide mononucleotide (NMN, 10  $\mu$ mol/L) with appropriate concentrations of described antagonists (FK866, 10  $\mu$ mol/L; CLI-095, 1  $\mu$ mol/L; MCC950, 100 nmol/L; y anakinra, 100  $\mu$ g/mL) were also performed in mesenteric microvessels from untreated C57BL/6 mice. Phosphorylated protein p65 (p-p65), a marker of NF- $\kappa$ B activation, the pro-inflammatory iNOS enzyme, and NLRP3 inflammasome were analysed in aortic homogenates from mice infused with visfatin/Nampt. Similarly, cultured human umbilical endothelial cells (HUVEC), were exposed to visfatin (25, 50 y 100 ng/mL) to analyze its effects on the expression of p-p65, as well as the proteins NLRP3-inflammasome and pro-interleukin (pro-IL)-1 $\beta$ , either with or without FK866 (10  $\mu$ mol/L), CLI-095 (1  $\mu$ mol/L), or MCC950 (1  $\mu$ mol/L).

Our results indicated that the mesenteric microvessels obtained from mice infused with visfatin/Nampt showed endothelial dysfunction to ACh but not changes to SNP. Moreover, an enhancement of aortic pro-inflammatory markers was observed. The endothelial dysfunction was abolished when the animals received also FK866, CLI-095, MCC950, or anakinra. The *ex vivo* visfatin/Nampt administration induced endothelial dysfunction that was abolished by FK866 or CLI-095, but not by MCC950 or anakinra. In HUVEC cultured, visfatin/Nampt enhanced the expression of p-p65, NLRP3 inflammasome, and pro-IL-1 $\beta$ , these effects being antagonized by FK866 and CLI-095. The confirmation about the role for the NLRP3 inflammasome in the endothelial dysfunction evoked by visfatin/Nampt was that IL-1 receptor blockade by anakinra antagonized the *in vivo* action of visfatin/Nampt, suggesting that the last effector for vascular damage was the tissular secretion of IL-1 $\beta$ , the final product of inflammasome activation.

We conclude that visfatin/Nampt produce endothelial dysfunction *in vivo*, consistently with its possible role as mediator of the vascular damage associated to cardiometabolic diseases. This adipokine is presenting several cellular and molecular mechanisms involved, such as the enzymatic Nampt activity and the activation of TLR4 through the synthesis of its enzymatic product NMN. Furthermore, the transcription factor NF- $\kappa$ B, the NLRP3 inflammasome expression and the paracrine secretion of mature IL-1 $\beta$  are also involved. Interestingly, the vascular deleterious effects by visfatin/Nampt were prevented by CLI-095 and anakinra. Indeed, targeting IL-1-receptors or TLR4 may represent therapeutic strategies to treat and / or prevent the vascular alterations linked to cardiometabolic diseases.

## **ABREVIATURAS**

<b>ACh:</b> acetilcolina	<b>CREB:</b> elemento de respuesta a AMPc
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>CRP:</b> proteína C reactiva
<b>ADNc:</b> ADN complementario	<b>Cu<sup>+</sup>:</b> cobre reducido
<b>AGEs:</b> Productos de glicación avanzada	<b>Cu<sup>2+</sup>:</b> catión de cobre
<b>AIM2:</b> proteína inducible por interferón, parte del inflammasoma	<b>Cys747:</b> sitio de unión a TLR4, en su dominio intracelular
<b>Akt o PKB:</b> proteína quinasa B	<b>DAMPs:</b> patrones moleculares asociados al tejido dañado
<b>AMP:</b> adenosin monofosfato	<b>DAPI:</b> de 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>AMPc:</b> adenosin monofosfato cíclico	<b>DMEM:</b> Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>Anakinra:</b> antagonista del receptor IL-1	<b>DMT1:</b> diabetes mellitus tipo 1
<b>Ang II:</b> angiotensina II	<b>DMT2:</b> diabetes mellitus tipo 2
<b>ANOVA:</b> análisis de la varianza	<b>DPP-4:</b> dipeptidil peptidase 4
<b>AP-1:</b> proteína activadora 1	<b>DUOX:</b> dual oxidasa, familia de Nox
<b>Apocinina:</b> 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona	<b>E-selectina:</b> molécula de adhesión celular endotelial
<b>ApoE-/-:</b> deficiente de la apolipoproteína E, knockout	<b>EARA:</b> Asociación Europea para la Investigación Animal
<b>ARN polimerasa II:</b> enzima de eucariotas que cataliza la transcripción del ADN a precursores de ARN mensajero	<b>EC<sub>50</sub>:</b> concentración de un fármaco requerida para obtener el 50% de la respuesta.
<b>ARN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>EDHF:</b> Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
<b>ARNm:</b> ácido desoxirribonucleico mensajero	<b>EDRF:</b> Factor relajante derivado de endotelio
<b>ASC:</b> proteína tipo punto asociada a apoptosis que contiene CARD	<b>EDTA:</b> ácido etilendiamino tetraacético
<b>ATP:</b> adenosin trifosfato	<b>EDTA Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:</b> Ácido etilendiaminotetraacético, dihidrato de disodio
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>EGCS:</b> suplemento de crecimiento de la célula endotelial
<b>BCA:</b> ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico	<b>EGTA:</b> ácido egtazic
<b>BCR:</b> receptor de células B	<b>eNamp1:</b> extracelular Namp1
<b>BH4:</b> tetrahidrobiopterina	<b>eNOS:</b> sintasa de óxido nítrico endotelial
<b>BMP-4:</b> proteína morfogénica ósea	<b>ERK 1/2:</b> quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2
<b>BMP-7:</b> proteína morfogénica ósea	<b>ES:</b> error estándar
<b>BSA:</b> albúmina de suero bovino	<b>ET-1:</b> endotelina-1
<b>c-Jun:</b> Factor de transcripción C-Jun	<b>FCS:</b> suero bovino fetal
<b>C57BL/6:</b> ratón de cepa endogámica C57black 6	<b>FGF21:</b> factor 21 de crecimiento de fibroblasto
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> calcio	<b>FK866/APO866:</b> inhibidor de Namp1,(E)-N-[4-(1-benzoilpiperidina-4-il) butil]-3-(piridin-3-il) acrilamida
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b> cloruro de calcio	<b>GC:</b> guanilato ciclasa
<b>CARD:</b> dominio de reclutamiento y activación de caspasa	<b>GPx:</b> glutatión peroxidasa
<b>Caspasa-1:</b> cisteína-aspartato-proteasas específica 1	<b>GPx1:</b> glutatión peroxidasa 1
<b>caspasa-11:</b> cisteína-aspartato-proteasas específica 11	<b>GPx4:</b> glutatión peroxidasa 4
<b>caspasa-3:</b> cisteína-aspartato-proteasas específica 3	<b>GTPasas:</b> guanosina trifosfatasa
<b>CBP:</b> Proteína de unión CREB	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> peróxido de hidrógeno
<b>CCL-2:</b> quimioquina C-C motif ligando 2	<b>HASMC:</b> células de músculo liso de la aorta humana
<b>CCR2:</b> C-C quimiocina receptor-2	<b>HCl:</b> ácido clorhídrico
<b>CD27:</b> molécula de la familia del TNFR	<b>HRP:</b> peroxidasa de rabano
<b>CD30:</b> molécula de la familia del TNFR	<b>HUGO:</b> Nomenclatura del Gen Humano
<b>CD36:</b> grupo de diferenciación 36, glicoproteína expresada en la superficie de membrana	<b>HUVEC:</b> células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano
<b>CD38:</b> grupo de diferenciación 38, antígeno de transmembrana	<b>IC:</b> índice de confianza
<b>CD40:</b> molécula de la familia del TNFR	<b>IC<sub>50</sub>:</b> concentración necesaria para una inhibición del 50%
<b>CD134:</b> molécula de la familia del TNFR	<b>ICAM-1:</b> molécula de adhesión intercelular-1
<b>CD137:</b> molécula de la familia del TNFR	<b>IFNs:</b> Interferones
<b>cGMP:</b> guanosina monofosfato cíclico	<b>IFN-α:</b> interferón alfa
<b>CLI-095:</b> inhibidor de la señalización de TLR4	<b>IFN-β:</b> interferón beta
<b>CO<sub>2</sub>:</b> dióxido de carbono	<b>IFN-γ:</b> interferón gamma
<b>Complete:</b> cocktail de inhibidores de proteasas	<b>IGF-1:</b> factor de crecimiento insulínico tipo 1
<b>COSCE:</b> Confederación de Sociedades Científicas de España	<b>IKK:</b> quinasas de IκB
<b>COX:</b> ciclooxigenasa	<b>IKKε:</b> quinasa de IκB épsilon
<b>COX-1:</b> ciclooxigenasa-1	<b>IKKα:</b> quinasa de IκB alfa
<b>COX-2:</b> ciclooxigenasa -2	<b>IKKβ:</b> quinasa de IκB beta



<b>IL-1:</b> interleuquina-1	<b>MYD88:</b> gen de la respuesta primaria de diferenciación mielóide 88
<b>IL-10:</b> interleuquina-10	<b>N2:</b> nitrógeno líquido
<b>IL-12:</b> interleuquina-12	<b>NA:</b> noradrenalina
<b>IL-13:</b> interleuquina-13	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:</b> fosfato de sodio
<b>IL-17:</b> interleuquina-17	<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:</b> ortovanato de sodio
<b>IL-18:</b> interleuquina-18	<b>NaCl:</b> cloruro de sodio
<b>IL-1A:</b> gen de IL-1 $\alpha$	<b>NAD:</b> dinucleótido de nicotinamida adenina
<b>IL-1B:</b> gen de IL-1 $\beta$	<b>NAD<sup>+</sup>:</b> dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma oxidada
<b>IL-1R:</b> receptor de IL-1	<b>NADH:</b> dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
<b>IL-1R1:</b> receptor de IL-1 tipo 1	<b>NADPH:</b> nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>IL-1RA:</b> antagonista del receptor de IL-1	<b>NADPH oxidasa:</b> enzima cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD <sup>+</sup> o NADP <sup>+</sup>
<b>IL-1<math>\alpha</math>:</b> interleuquina-1 $\alpha$	<b>NaF:</b> fluoruro sódico
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b> interleuquina-1 $\beta$	<b>NaHCO<sub>3</sub>:</b> bicarbonato de sodio
<b>IL-6:</b> interleuquina-6	<b>NAM:</b> nicotinamida
<b>IL-8:</b> interleuquina-8	<b>Nampt:</b> nicotinamida fosforribosil transferasa
<b>iNAMPT:</b> intracelular Nampt	<b>NBD:</b> dominio de unión a nucleótidos
<b>iNOS:</b> sintasa de óxido nítrico inducible	<b>NEK7:</b> quinasa relacionada a NIMA 7
<b>InsP3:</b> inositol-1,4,5-trifosfato	<b>NF-<math>\kappa</math>B p-p65:</b> subunidad p65 fosforilada del factor de transcripción NF- $\kappa$ B
<b>IPAF o NLR4:</b> familia NLR con dominio CARD que contiene la proteína 4	<b>NF-<math>\kappa</math>B p65:</b> subunidad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B
<b>IRAK-1:</b> quinasa 1 asociada al receptor de la IL-1	<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> factor nuclear kappa-B
<b>IRAK:</b> quinasa asociada al receptor de la IL-1	<b>NK:</b> células natural killer
<b>IRF:</b> factor de transcripción regulador del interferón	<b>NLR:</b> familia de receptores similares a NOD
<b>IRF3:</b> factor regulador del interferón 3	<b>NLRC4:</b> miembro de la familia NLR
<b>I<math>\kappa</math>B:</b> inhibidor de kappaB	<b>NLRP1:</b> Familia NLR conteniendo dominio piridina 1
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>:</b> inhibidor de kappaB	<b>NLRP12:</b> Familia NLR conteniendo dominio piridina 12
<b>JAK:</b> quinasa de Jano	<b>NLRP2:</b> Familia NLR conteniendo dominio piridina 2
<b>JAK2:</b> quinasa de Jano 2	<b>NLRP3:</b> Familia NLR conteniendo dominio piridina 3
<b>JNK:</b> quinasa N-terminal de c-Jun, quinasa activadas por mitógenos que responden a estímulos de estrés	<b>NLRP6:</b> Familia NLR conteniendo dominio piridina 6
<b>Jun NH2 o JNK:</b> quinasa N-terminal de c-Jun, miembros de la familia MAPK	<b>NLRP7:</b> Familia NLR conteniendo dominio piridina 7
<b>K<sup>+</sup>:</b> potasio	<b>NMN:</b> mononucleótido de nicotinamida
<b>KCl:</b> Cloruro de potasio	<b>Nnmat:</b> nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa
<b>kDa:</b> kilo Dalton, unidad de medida	<b>nNOS:</b> sintasa de óxido nítrico neuronal
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b> fosfato de potasio	<b>NO:</b> óxido nítrico
<b>KHS:</b> solución de Krebs-Henseleit	<b>NOS:</b> sintasa de óxido nítrico
<b>LDL:</b> lipoproteína de baja densidad	<b>Nox:</b> nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
<b>LPO:</b> lipooxigenasa	<b>Nox-1:</b> nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 1
<b>LPS:</b> lipopolisacárido	<b>Nox-2:</b> nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 2
<b>LRR:</b> dominio repetido rico en leucina	<b>Nox-4:</b> nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4
<b>Lys53:</b> residuos monometilados	<b>NP-40:</b> detergente
<b>M:</b> molar	<b>O<sub>2</sub>:</b> Oxígeno molecular
<b>M1:</b> macrófago pro-inflamatorio (activado vía clásica)	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b> anión superóxido
<b>M199:</b> Medio 199 para cultivo celular	<b>OH*:</b> radical hidroxilo
<b>M2:</b> macrófago anti-inflamatorio (activado vía alterna)	<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> peroxinitrito
<b>MAPK:</b> quinasas activadas por mitógeno	<b>P-selectina:</b> molécula de adhesión celular plaquetaria
<b>MCC950:</b> inhibidor específico del inflamasoma NLRP3	<b>p&lt;0.05:</b> estadísticamente significativo
<b>MCP-1:</b> proteína quimioatrayente de monocitos-1	<b>p22phox:</b> componente de membrana de NADPH oxidasa
<b>media <math>\pm</math> ES:</b> media más el error estándar	
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:</b> sulfato de magnesio heptahidrato	
<b>MIP-1<math>\alpha</math>:</b> quimiocina proteína 1 $\alpha$ inflamatoria de macrófago	
<b>MMP-2:</b> metaloproteínasa de la matriz extracelular-2	
<b>MMP-9:</b> metaloproteínasa de la matriz extracelular-9	
<b>MMPs:</b> metaloproteínasa de matriz extracelular	
<b>mN:</b> mili Newtons	

<b>p300</b> : cofactor que interactúa con factores de transcripción	<b>SNP</b> : nitroprusiato sódico
<b>p47phox</b> : subunidad de NADPH oxidasa	<b>SNPs</b> : polimorfismo de nucleótidos únicos
<b>p50/c-Rel</b> : proteína componente de NF- $\kappa$ B	<b>SOD</b> : superóxido dismutasa
<b>p50/RelA</b> : proteína componente de NF- $\kappa$ B	<b>SP-1</b> : proteína específica 1
<b>PAMPs</b> : patrones moleculares asociados a patógenos	<b>SQ 29, 548</b> : antagonista del receptor del tromboxano A2
<b>PARP</b> : enzima poli ADP ribosa polimerasa	<b>STAT</b> : transductor de señal y activador de la transcripción
<b>pb</b> : pares de bases	<b>STAT3</b> : transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>PBEF</b> : factor estimulante de colonias de células pre-B	<b>T CD4+</b> : linfocitos T que expresan la proteína CD4 en la superficie
<b>PBS</b> : tampón fosfato salino	<b>T.A.</b> : temperatura ambiente
<b>pEC50</b> : logaritmo negativo de EC50	<b>TAK1</b> : quinasa activada TGF- $\beta$
<b>PG</b> : prostaglandina	<b>TANK 1 o TBK1</b> : proteína quinasa serina/treonina, miembro de la familia TRAF asociado a la activación de NF- $\kappa$ B
<b>PGI2</b> : prostaciclina I2	<b>TBS-T</b> : tampón salino de Tris y Tween 20
<b>PI3-quinasa-AKT</b> : vía fosfatidilinositol 3-quinasa	<b>TCR</b> : receptor de linfocitos T
<b>PI3K</b> : fosfatidilinositol 3-quinasa	<b>Tfh</b> : linfocitos T colaborador folicular
<b>pro IL-1<math>\beta</math></b> : forma inmadura de la citoquina IL-1 $\beta$	<b>TGF-<math>\beta</math></b> : factor de crecimiento transformante beta
<b>pro-IL-18</b> : forma inmadura de la citoquina IL-18	<b>TGF-<math>\beta</math>1</b> : factor de crecimiento transformante beta-1
<b>PRRs</b> : receptores que reconocen patrones	<b>TH1</b> : linfocitos T colaborador 1
<b>PYD</b> : piridina	<b>TH17</b> : linfocitos T helper 17
<b>r.p.m.</b> : revoluciones por minuto	<b>TH2</b> : linfocitos T colaborador 2
<b>Ratón db/db</b> : modelo de ratón diabético	<b>TIR</b> : receptor tipo Toll/ IL-1R
<b>RBP4</b> : proteína de unión al retinol tipo 4	<b>TIRAP</b> : Proteína adaptadora que contiene el dominio Toll/IL-1
<b>ROS</b> : especies reactivas de oxígeno	<b>TLR</b> : receptor tipo toll
<b>SDS</b> : dodecilsulfato sódico	<b>TLR4</b> : receptor tipo toll 4
<b>SDS-PAGE</b> : electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> : factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>Ser/Thr</b> : serina/treonina	<b>TNFR</b> : receptor del factor de necrosis tumoral
<b>sGC</b> : guanilato ciclasa soluble	<b>VEGF</b> : factor de crecimiento endotelial vascular
<b>SIRT1</b> : sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD	<b>VEGFR-2</b> : receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
<b>TLR5</b> : receptor tipo toll 5	<b>VSMC</b> : vascular smooth muscle cell, células del músculo liso vascular
<b>TNF</b> : factor de necrosis tumoral	<b>XIAP</b> : inhibidor de la proteína apoptótica ligada al X
<b>TP</b> : receptor del tromboxano A2.	<b>Zn</b> : zinc
<b>TRAF3</b> : factor 3 asociado al receptor TNF	<b><math>\kappa</math>RE</b> : elemento de respuesta
<b>TRAF6</b> : factor 6 asociado al receptor TNF	
<b>TRIF</b> : adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN- $\beta$	
<b>Tripsina</b> : enzima peptidasa	
<b>Tris-HCl</b> : TRIS hydrochloride	
<b>Tris</b> : 2-amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol hydrochloride	
<b>Triton X-100</b> : tensoactivo no iónico	
<b>Tween 20</b> : agregado de polisorbato 20	
<b>TXA<sub>2</sub></b> : tromboxano A2	
<b>TXAS</b> : tromboxano sintasa	
<b>VCAM-1</b> : molécula de adhesión vascular-1	

# I INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL ENDOTELIO VASCULAR

El endotelio es un órgano metabólicamente activo con importancia endocrina, paracrina y autocrina (Vallance et al., 2001) que tiene un papel central en la función vascular, como mantener la homeostasis vascular y prevenir la trombosis, con un delicado balance entre vasodilatación y vasoconstricción y entre mediadores pro y anticoagulantes (De Meyer, 1997) (Fig. 1).

El endotelio constituye una gran barrera, selectiva para solutos y fluidos, entre la circulación sanguínea y los tejidos; que detecta, integra y traduce señales presentes en la circulación frente a distintos estímulos biológicos. Puede modular la actividad contráctil de la célula muscular lisa vascular, regulando el tono y flujo vascular y la presión arterial sistémica (Khaddaj et al., 2017). Su estructura dinámica está en constante remodelado frente a mecanismos físicos, químicos o inflamatorios, lo que está regulado por un programa coordinado de activación génica y una variedad de mecanismos de señalización, como segundos mensajeros, quinasas, fosfatasa y GTPasas que determinan remodelados en el citoesqueleto, modulan la contractilidad celular e intervienen en la organización de las uniones celulares y la adhesión focal, produciendo una respuesta adaptativa a estímulos potencialmente nocivos (Oldenburg et al., 2014; Trani y Dejana, 2015).

Las relajaciones dependientes de endotelio están mediadas por tres vasodilatadores principales: el inicialmente denominado factor relajante derivado de endotelio (EDRF) y posteriormente identificado como óxido nítrico (NO) producido por la sintasa de NO endotelial (eNOS), el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) derivada de la ciclooxigenasa (COX) (Loscalzo, 2013). También se ha descrito el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como vasodilatador durante la disfunción endotelial con baja disponibilidad de NO (Ellinsworth et al., 2016), que se forma como subproducto del metabolismo oxidativo del endotelio y de las células del músculo liso vascular (VSMC) (Shimokawa, 2004).

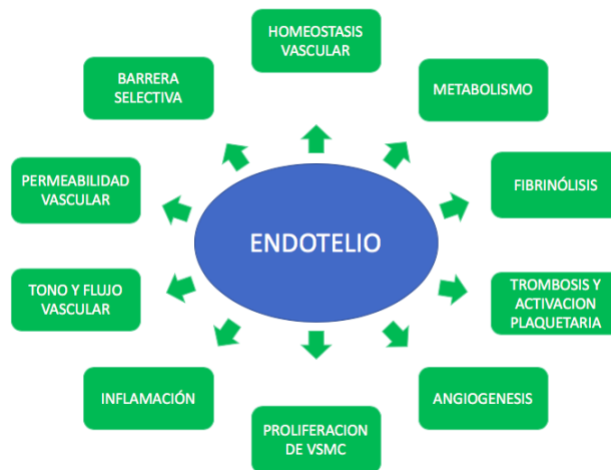
El NO endotelial es liberado como respuesta a mediadores circulantes que actúan sobre receptores específicos localizados en la membrana celular (por ej, la acetilcolina, ACh, actuando sobre el receptor muscarínico M3). Su activación facilita la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático a través de la producción de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>), permitiendo la activación de eNOS (Khaddaj et al., 2017). La síntesis de NO puede ser también estimulada por fluctuaciones en el flujo sanguíneo (Sessa, 2004; Dudzinski y Michel, 2007), mientras que la transcripción del gen eNOS es regulado por las fuerzas mecánicas del fluido (Chiu y Chien, 2011).

Una vez sintetizado el NO por la eNOS, se difunde rápidamente a través de la membrana celular del endotelio para actuar como molécula paracrina en el músculo liso vascular subyacente, activando la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC) e incrementando la guanosina

monofosfato cíclico (cGMP) y la fosforilación de Ser/Thr de proteínas múltiples que promueven la relajación del músculo liso y vasodilatación (Stamler et al., 1992; McDonald y Murad, 1996; Kyle y Braun, 2014). De hecho, el NO es el agente endógeno vasodilatador más importante del organismo, de modo que su inhibición produce aumento del tono vascular e hipertensión y es una característica determinante del proceso de disfunción endotelial (Mudau et al., 2012).

Por otro lado, el endotelio modula el tono vascular liberando también péptidos vasoconstrictores, como angiotensina II (Ang II) y endotelina-1 (ET-1), o prostanoideos como el tromboxano A2 (Chhabra, 2009; Strijdom y Lochner, 2009). Esos agentes vasoconstrictores son predominantemente locales, pero pueden tener un efecto sistémico y un papel en la regulación del remodelado y la estructura de la pared arterial (Deanfield et al., 2007).

En definitiva, el endotelio vascular se puede describir como un órgano ampliamente distribuido que constituye una interfaz dinámicamente adaptable, con características individuales de las células endoteliales que funcionan como transductores mecánicos y un integrador del medio fisiopatológico (Gimbrone et al., 2016).



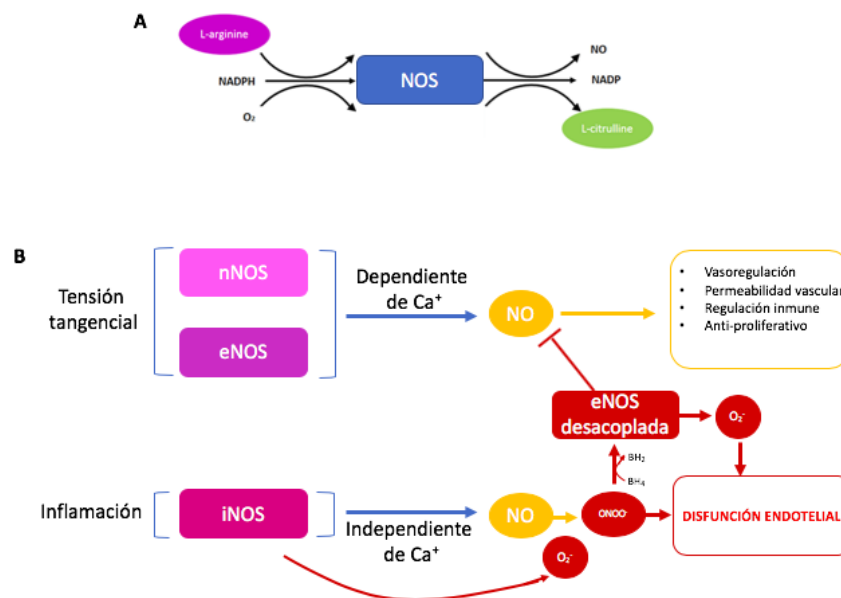
**Figura 1.** Funciones del endotelio (Modificado de Sena et al., 2013)

## 1.2 PAPEL FISIOLÓGICO DEL NO

La síntesis de NO se realiza por una familia de enzimas, las sintasas de NO (NOS), de las que hay tres isoformas (Fig. 2); neuronal (nNOS), inducible (iNOS), y la endotelial (eNOS) ya mencionada (Bryan et al., 2009). Fisiológicamente nNOS y eNOS son enzimas constitutivas dependientes de  $Ca^{2+}$  que producen de forma continuada bajos niveles de NO. Por otro lado, la expresión de iNOS es independiente de calcio y es inducida por citoquinas inflamatorias, produciendo grandes cantidades de NO (Strijdom et al., 2009). Como se ha indicado, la isoforma eNOS es responsable de la producción vascular de NO en condiciones fisiológicas, que origina relajación en las VSMC (Dudzinski y Michel, 2007). La enzima eNOS reside en la caveola y está unida a la proteína caveolina-1, que inhibe su actividad. La elevación

de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático promueve que la calmodulina desplace a la caveolina-1 y se una a eNOS para activarla (Dessy et al., 2010; Durán et al., 2010). La eNOS utiliza como sustrato a L-arginina, como co-sustrato a una molécula de oxígeno y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y como cofactores para la síntesis de NO a tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) y calmodulina (Moncada y Higgs 2006) (Fig. 2A).

Además de sus propiedades vasodilatadoras, el NO tiene efectos anti-inflamatorios y cardioprotectores (Moncada et al., 1988). Así, el NO previene la adhesión y migración leucocitaria, la proliferación de las VSMC, evita la adhesión y agregación plaquetaria, y tiene efecto anti-aterogénico, evitando la apoptosis y la inflamación (Wheatcroft et al., 2003) (Fig. 2B). La vida media de NO es corta, menos de 4 segundos, y rápidamente se metaboliza a nitrito y nitrato antes de ser excretado por la orina (Moncada y Higgs, 2006).



**Figura 2.** Isoformas de la NOS. **A.** Producción de NO. **B.** Efectos de NO producidos por las isoformas de NOS. (Modificado de Lind et al., 2017; Chen et al., 2018).

### 1.3 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El deterioro de la función endotelial puede definirse como un desbalance en la homeostasis vascular, que disminuye sus propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias, incrementando la permeabilidad vascular a lipoproteínas y permitiendo el reclutamiento selectivo de monocitos circulantes desde la sangre hasta la íntima, donde se diferenciarán en macrófagos. El endotelio activado y los macrófagos pueden secretar múltiples citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión y factores de crecimiento que pueden actuar en las células musculares lisas produciendo proliferación celular y síntesis de matriz extracelular (Libby, 2012; Hansson y Libby, 2006). Estos eventos inflamatorios incrementan la producción de agentes vasoconstrictores y favorecen la presencia del estrés oxidativo intracelular, la activación de la enzima NADPH oxidasa productora de anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y el incremento de especies

reactivas de oxígeno (ROS). Además, el aumento de las ROS conduce a la oxidación del  $BH_4$  y a la disminución del sustrato L-arginina, lo que origina el desacoplamiento de la actividad enzimática de la eNOS, convirtiéndola en una fuente adicional generadora de ROS (Vásquez-Vivar et al., 1998; Förstermann y Münzel, 2006).

El anión superóxido producido en exceso se combina con el NO remanente y aumenta la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un radical libre extremadamente agresivo que reduce aún más la vasodilatación dependiente de endotelio. En consecuencia, se altera la hemodinámica circulatoria, se deteriora la habilidad fibrinolítica, se incrementa la expresión de moléculas de adhesión y genes inflamatorios y hay una sobreproducción de factores de crecimiento, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad de la capa celular endotelial (Cade et al., 2008; Laughlin et al., 2008; Addabbo et al., 2009; Hirose et al., 2010).

Posteriormente, el desarrollo de estas lesiones puede ir progresando desde una simple respuesta inflamatoria hasta la formación del ateroma, con una capa fibrosa, cubierta por otra de lípidos, así como depósitos de lipoproteínas oxidadas necróticas, cristales de colesterol, detritus celulares, remodelado de la matriz extracelular y calcificación (Libby, 2012; Hansson y Libby, 2006). Todos estos fenómenos constituyen los estadios tempranos de aterosclerosis, entre cuyas características se incluye el deterioro de las relajaciones dependiente de endotelio y la reducida biodisponibilidad de NO (Förstermann, 2010).

Como mecanismo de defensa, la activación del endotelio vascular puede variar según la naturaleza, extensión, duración y combinación de los estímulos pro-inflamatorios, y se convierte más rápidamente en una respuesta pro-aterogénico si hay factores de riesgo adicionales como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes u otras condiciones inflamatorias (Deanfield et al., 2007). En este sentido, como se trata de una respuesta muy temprana, la disfunción endotelial puede predecir la morbilidad y mortalidad en grupos de pacientes con riesgo cardiovascular (Cross, 2002). Por ello, una detección temprana de disfunción endotelial podría permitir intervenciones terapéuticas en fases aún reversibles del desarrollo de la aterosclerosis (Park K y Park W, 2015).

### 1.4 MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

#### 1.4.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo parece ser el mecanismo más común en el desarrollo de la disfunción endotelial. La señalización redox celular se activa como parte de la inflamación, en respuesta a la exposición a citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (Förstermann y Münzel, 2006). Las ROS son un grupo de moléculas de oxígeno y sus derivados, caracterizados por ser radicales libres, es decir, poseer uno o más electrones desapareados. Entre ellos se incluyen los aniones superóxido, radicales hidroxilos ( $OH^\bullet$ ), el propio óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (Cai y

Harrison, 2000). En presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), el  $O_2^{\cdot-}$  se transforma en  $H_2O_2$ , el cual se difunde rápidamente a través de las células (Rhee, 2006), promoviendo directamente hipertrofia de las VSMC, activando metaloproteinasas y, en concentraciones más altas, inhibiendo eNOS (Loot et al., 2009).

Entre las principales fuentes de ROS descritas en el endotelio vascular, se encuentran la mitocondria (Dolinsky et al., 2016) y la enzima NADPH oxidasa (Lassègue et al., 2012), así como la xantina oxidasa (Kelley, 2015), que aumentan su actividad arterial durante la enfermedad coronaria (Griendling et al., 2000; Evans et al., 2002; Spiekermann et al., 2003), además del ya mencionado desacoplamiento de la eNOS (Förstermann y Münzel, 2006; Montezano y Touyz, 2012). En condiciones fisiológicas, estas enzimas se expresan en niveles bajos en las membranas del retículo endoplásmico y núcleo, donde contribuyen a procesos de señalización redox intracelular (Drummond y Sobey, 2014) y juegan un papel crítico en el mantenimiento, proliferación y supervivencia celular.

La excesiva producción de ROS fosforila varios factores de transcripción, activa la proteasa, induce el remodelado de la cromatina nuclear y la transcripción de genes (Deanfield et al., 2007), lo que contribuye a la oxidación del ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos, y afecta la funcionalidad de múltiples macromoléculas (Cai y Harrison, 2000), incluyendo proteínas de matriz extracelular. Asimismo, las ROS pueden estimular la transcripción de genes pro-inflamatorios y la expresión de proteínas a través de la activación de factores de transcripción sensibles a redox tales como el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) (Janssen-Heininger et al., 2000) y citoquinas pro-inflamatorias, incluida la IL-1, la cual puede promover aún más la producción de ROS a través de mecanismos que incluyen la activación del receptor de Ang II y NADPH oxidasa (Wassmann et al., 2004).

Por tanto, la producción crónica de ROS puede exceder la capacidad antioxidante de enzimas y agentes reductores intracelulares y contribuir a la enfermedad vascular por inducir una activación endotelial sostenida (Dolinsky et al., 2016).

### 1.4.2 NADPH oxidasa

Las enzimas NADPH oxidasas pertenecen a una familia de enzimas que además de generar ROS son determinantes en el estado redox de la pared vascular, así como en la fisiopatología de varios fenotipos vasculares. Estas enzimas están presentes en las células endoteliales, VSMC, fibroblastos, monocitos y macrófagos infiltrados (Burtenshaw et al., 2017) (Fig. 3).

En mamíferos, las isoformas de NADPH oxidasa tienen una subunidad catalizadora llamada Nox (Nox-1-5) o dual oxidasa 1 y 2 (DUOX-1-2) y hasta siete subunidades reguladoras, que dan formación a siete isoformas catalíticas de Nox. De éstas, al menos cinco se expresan



en la pared vascular (Bedard y Krause, 2007; Lassègue y Griendling, 2010). Las células endoteliales expresan Nox-1, Nox-2, Nox-4 y Nox-5. Las VSMC expresan Nox-1, Nox-4 y Nox-5, mientras que las células adventicias expresan Nox-2 y Nox-4 (Konior et al., 2014; Violi y Pignatelli, 2015; García-Redondo et al., 2016).

Nox-1 y Nox-2 inducen aterogénesis promoviendo la inflamación intrínseca y extrínseca en las células de la pared vascular (Lassègue y Griendling, 2010). Nox-1 ha sido asociado a enfermedades cardiovasculares o diabetes mellitus (Gray et al., 2016). Nox-2 se expresa en fagocitos (neutrófilos y macrófagos) y plaquetas donde tiene un papel central en la generación de  $O_2^{\cdot-}$  mediante la expresión del ligando CD40, una proteína con propiedades pro-inflamatorias y pro-trombóticas (Violi y Pignatelli, 2015).

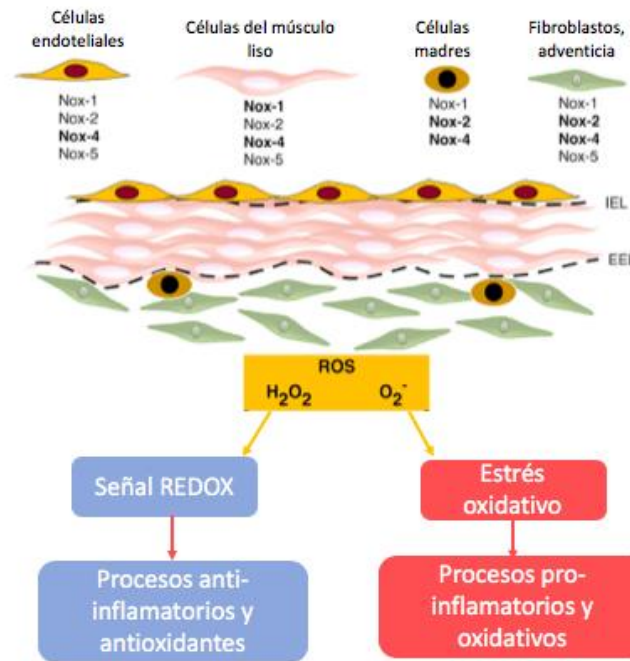
Nox-4 se expresa de forma ubicua en las VSMC, con funciones determinantes en la homeostasis y en la enfermedad vascular (Lu et al., 2013) y se localiza en la mitocondria contribuyendo a los niveles de ROS mitocondrial (Vendrov et al., 2015). Además, la expresión y la actividad de Nox-4 aumentan significativamente en las células de la pared vascular por la acción de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios. El factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) (Fernández et al., 2015) induce la expresión de Nox-4 y aumenta la producción de ROS mitocondrial en varios tipos celulares (Liu et al., 2015). A su vez, ROS inducen y activan TGF- $\beta 1$  en un ciclo que autoperpetúa y amplifica el estrés oxidativo, junto con la supresión de enzimas antioxidantes, como SOD mitocondrial (Michaeloudes et al., 2010). Es posible que el desequilibrio redox inducido por TGF- $\beta 1$  activa los factores de transcripción Jun y NF- $\kappa B$  que, a su vez, estimulan la expresión Nox-4, resultando en inflamación (Lozhkin et al., 2017).

En arterias coronarias humanas la expresión de Nox-4 aumenta progresivamente desde el estado I al estado IV de aterosclerosis (Sorescu et al., 2002). Se acepta que Nox-4 es un regulador nodal de la inflamación en el envejecimiento (Rodríguez-Mañás et al., 2009) y la aterosclerosis (Vendrov et al., 2015; Lozhkin et al., 2017), por lo que la inhibición de la expresión y actividad de Nox-4 podría ofrecer un nuevo enfoque terapéutico para tratar la inflamación asociada al envejecimiento y a las enfermedades cardiovasculares (Lozhkin et al., 2017).

Existe una correlación positiva entre los niveles de Nox-4 e IL-6 en las VSMC de ratones con envejecimiento y en las lesiones ateroscleróticas humanas, lo cual indica que IL-6 participa en el desarrollo de la aterogénesis en ratones envejecidos (Huber et al., 1999). Asimismo, los niveles elevados de IL-6 se asocian con un mayor riesgo de infarto del miocardio (Ridker et al., 2000).

Finalmente, se ha demostrado que Nox-5 está regulado positivamente en la aterosclerosis y en las lesiones coronarias avanzadas (Guzik et al., 2008). Nox-5 se expresa en

monocitos y macrófagos humanos dentro de placas ateroscleróticas de la arteria carótida humana (Manea et al., 2015).



**Figura 3.** Enzimas Nox en la vasculatura (Burtenshaw et al., 2017).

#### 1.4.3 Papel de las enzimas antioxidantes

Las células vasculares tienen una gran variedad de enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa frente a una carga oxidativa excesiva. En condiciones patológicas, la expresión de estas enzimas está alterada, favoreciendo la actividad de las ROS y la consecuente disfunción endotelial (Förstermann et al., 2017). Entre las enzimas con mayor relevancia están SOD, catalasa y glutatión peroxidasa.

**SOD.** Tiene tres isoformas: SOD1, localizada en el citoplasma y en el espacio intermembrana de la mitocondria; SOD2, expresada en la matriz mitocondrial; y SOD3, localizada en la matriz extracelular o en la superficie celular (Faraci et al., 2004; Fukai et al., 2011). Las tres isoformas tienen funciones antioxidantes y reducen el anión superóxido a  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  (Li et al., 2014; Förstermann y Sessa, 2011). Sin embargo, la excesiva actividad de SOD1 podría aumentar el daño oxidativo y generar altas cantidades de peróxido de hidrógeno que darían formación a moléculas pro-aterogénicas como radicales hidroxilo o ROS asociados a metales (Fukai et al., 2011). En cambio, la deficiencia de SOD2 conduce a la disfunción mitocondrial, incremento del daño mitocondrial y aceleración de la aterosclerosis (Ballinger et al., 2002).

**Catalasa.** Se encuentra en el peroxisoma, es responsable de la catálisis de  $H_2O_2$  a  $O_2$  y  $H_2O$ . Se ha observado que la sobreexpresión de catalasa reduce la aterosclerosis en ratones (Yang et al., 2004).

**Glutathion peroxidasa (GPx).** Representa la principal enzima antioxidante dentro de muchas células (Lubos et al., 2011). GPx1 se expresa en la mitocondria y el citoplasma. Una baja actividad de glutatión peroxidasa en los eritrocitos es asociado a riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedades de la arteria coronaria (Blankenberg et al., 2004). Su deficiencia incrementa la oxidación de LDL, formación de células espumosas y proliferación de macrófagos (Cheng et al., 2013). Por su parte, GPx4 tiene propiedades anti-ateroscleróticas, previene la peroxidación lipídica y la detección de lípidos oxidados por las células vasculares (Guo et al., 2008).

### 1.4.4 Inflamación vascular

La inflamación es otro mecanismo común en la disfunción endotelial y parece tener una relación estrecha con el estrés oxidativo, ya que un endotelio disfuncional promueve la generación de ROS, el cual amplificará las vías de señalización de la inflamación vascular, mientras que las células inflamatorias liberarán anión superóxido, en un ciclo perjudicial para el sistema vascular (Karbach et al., 2014).

La célula endotelial participa en las respuestas inmunes innatas y adaptativas. La activación de la célula endotelial sirve como respuesta de defensa y permite reclutar células inmunes a través del endotelio (Danese et al., 2007; Pober y Sessa, 2007). Frente a una respuesta crónica y persistente, la célula endotelial produce inflamación y disfunción endotelial, características tempranas de las patologías relacionadas con el sistema cardiovascular (Witztum y Lichtman, 2014).

Las células endoteliales pueden modular su fenotipo funcional en respuesta a ciertos productos bacterianos, patógenos o citoquinas tales como interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Pober y Cotran, 1990). La activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, activa proteínas efectoras, tales como moléculas de adhesión endotelial-leucocitaria inducibles (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1), moléculas pro-coagulantes, y quimioquinas secretadas, como Interleuquina-8 (IL-8) y proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) (Pober y Gimbrone, 1982; Rollins et al., 1990). Todo ello constituye lo que se denomina "fenotipo endotelial pro-inflamatorio" (Gimbrone et al., 2016). Adicionalmente, los niveles vasculares de VCAM-1 aumentan con la edad en pacientes sanos (Richter et al., 2003) y se asocian con el desarrollo de aterosclerosis tanto en modelos experimentales (Cybulsky et al., 2001; Vendrov et al., 2015) como en pacientes humanos (Semaan et al., 2000).

#### 1.4.4.1 Señalización de NF- $\kappa$ B

El NF- $\kappa$ B pertenece a una familia de factores de transcripción inducibles, que regulan la expresión de una serie de genes implicados con las respuestas inmunes o inflamatorias y se asocian a patologías como la aterosclerosis (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Las proteínas NF-

$\kappa$ B se ubican en el citoplasma unidas a proteínas inhibidoras de la familia I $\kappa$ B (Sun, 2011). Su activación depende del tipo de estímulo, para desarrollar el mecanismo de señalización canónica, asociado a la respuesta inmune y a receptores tales como receptor de reconocimiento de patrones (PRRs), receptor del TNF- $\alpha$  (TNFR), receptor de linfocitos T (TCR) y receptor de linfocitos B (BCR) (Zhang y Sun, 2015), o vía alterna, regulador de las funciones específicas del sistema inmune adaptativo (Sun y Liu, 2011). Por tanto, NF- $\kappa$ B es considerado un marcador de inflamación crónica (Liu et al., 2017) (Fig. 4).

NF- $\kappa$ B parece jugar un papel central en la activación pro-inflamatoria del endotelio en la aterogénesis, ya que incrementa la expresión de muchas de las moléculas efectoras asociadas con la disfunción endotelial, como citoquinas pro-inflamatorias, factores quimiotácticos y moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1), los cuales a su vez promueven el reclutamiento de monocitos y la progresión de la enfermedad (Collins y Cybulsky, 2001). Estudios recientes sugieren que la activación de NF- $\kappa$ B también puede dar lugar a cambios fundamentales en la estructura de la cromatina endotelial, a través de la formación de complejos potenciadores, que pueden conferir un nivel epigenético de regulación al fenotipo endotelial pro-inflamatorio en la aterogénesis (Brown et al., 2014).

### *1.4.4.1.1 Regulación molecular de la señalización de NF- $\kappa$ B*

Las células inmunes innatas, incluidos los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos, expresan PRRs (Newton y Dixit, 2012) que incluyen a los “toll like receptors” (TLR), los cuales detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como los componentes microbianos y patrones moleculares asociados al tejido dañado (DAMPs) (Newton y Dixit, 2012). Los PRRs activan la vía canónica de NF- $\kappa$ B en diferentes tipos celulares (Hayden y Ghosh, 2011), mediante la activación del complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK), que fosforila a la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  en las dos N-terminales de serina, produciendo su degradación y desencadenando la translocación nuclear de los dímeros p50/RelA y p50/c-Rel de NF- $\kappa$ B, éste último responsable de la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y otros mediadores de la inflamación (Karin y Delhase, 2000; Hayden y Ghosh, 2008).

Los macrófagos también se activan secretando una serie de citoquinas y quimioquinas en respuesta a diversos PAMPs y DAMPs. En condiciones patológicas, los macrófagos se diferencian fenotípicamente en dos tipos. El fenotipo M1 se caracteriza por producir citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , COX-2 y diferencian a las células T en Th1 y Th17 (Wang et al., 2014), mientras que el fenotipo M2 produce citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-13 (Mosser, 2003).

***Vía canónica en macrófagos activados***

La señalización de "toll like receptors" (TLR) juega un papel importante en la regulación de los macrófagos. El lipopolisacárido (LPS), ligando de TLR4, promueve el fenotipo M1 a través de dos receptores TLR: MyD88 y Toll/IL-1 (TRIF) (Lu et al., 2008). La señalización de TLR dependiente de MyD88 desencadena la activación de la familia de quinasas IRAK, la ubiquitinación de TRAF6 y la activación de una quinasa dependiente de ubiquitina (TAK1) quien activa la quinasa IKK, la cual fosforila y degrada al inhibidor  $I\kappa B\alpha$ , produciendo la activación de NF- $\kappa$ B (Lu et al., 2008). En cambio, la señalización de TLR dependiente de TRIF induce interferón (IFNs) Tipo I, el cual implica el reclutamiento del receptor TNF asociado a factor 3 (TRAF3), la posterior activación de TANK quinasa 1 (TBK1) e IKK $\epsilon$  y la fosforilación y dimerización del factor de transcripción IRF3 que conduce a la inducción transcripcional de IFNs tipo I, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (Kawai y Akira, 2010; Wang et al., 2014). TRIF también está implicado en el reclutamiento y la activación de IKK (Kawai y Akira, 2010; Wang et al., 2014). El NF- $\kappa$ B estimulado por TRIF media la inducción de genes de citoquinas inflamatorias tal como se observa en la vía MyD88 (Liu et al., 2017).

***Vía no canónica en diferentes tipos celulares***

En condiciones fisiológicas la señalización no canónica de NF- $\kappa$ B interviene en la supervivencia y la homeostasis de las células B, la diferenciación de los monocitos a osteoclastos, la producción de quimioquinas en células endoteliales, las respuestas del glucagón en los hepatocitos y la función efectora de las células T helper 17 (TH17) (Xie P. et al., 2007; Majer et al., 2015; Li et al., 2016). En condiciones patológicas ocurre una activación aberrante de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B, debido a la producción incontrolada de agentes inductores o deficiencias genéticas de los reguladores negativos de los genes. Las células T se activan tras la mediación de la señalización TCR por los dímeros RelA y c-Rel de NF- $\kappa$ B. Tras la activación, las células T CD4<sup>+</sup> se diferencian en las células efectoras Th1, Th2, Th17 y T folicular (Tfh), las cuales secretan citoquinas y median en diferentes aspectos de las respuestas inmunes (Zhu et al., 2009). Las células Th1 secretan IFN- $\gamma$ , una citoquina que promueve la inmunidad celular y participa en procesos inflamatorios (Oh y Ghosh, 2013). Las células Th17 se caracterizan por la secreción de IL-17, una citoquina inflamatoria que recluta monocitos y neutrófilos al sitio de inflamación en respuesta a la invasión por patógenos o autoantígenos (Liu et al., 2017).

Aunque la vía de NF- $\kappa$ B no canónica es prescindible para la activación de células T, esta vía es necesaria para diferenciar las respuestas de memoria o efectoras de las células T frente a antígenos específicos. La activación no canónica de las células T se asocia con la expresión inducible de varios TNFR, incluidos CD27, CD30, CD134 y CD137, que están comprometidos por sus ligandos en células presentadoras de antígeno (Croft, 2009).

Ambas vías canónicas y no canónicas de NF- $\kappa$ B están involucradas en la generación y funciones efectoras de las células T inflamatorias, aunque difieren en mecanismos de activación y función (Liu et al., 2017).

1.4.4.1.2 Regulación de NF- $\kappa$ B translocado al núcleo

Una vez que NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo, se une a los elementos de respuesta  $\kappa$ B ( $\kappa$ RE) presentes en los promotores de citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, enzimas inflamatorias y receptores. La unión de NF- $\kappa$ B a  $\kappa$ RE desencadena la formación de potenciasomas, que son complejos de nucleoproteínas con varios factores de transcripción como la ARN Polimerasa II, los cofactores p300 y la proteína de unión CREB (CBP), asegurando la inducción espacial y temporal de un gen específico (Hoffmann y Baltimore, 2006; Sen y Smale, 2010).

Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, proteína específica 1 (SP-1), factor de transcripción regulador del interferón (IRF), transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), elemento de respuesta a AMPc (CREB) y la proteína activadora 1 (AP-1) se vinculan a sus respectivos  $\kappa$ RE dentro de una región potenciadora del gen diana. Si bien muchos de los genes diana inducidos por NF- $\kappa$ B son pro-inflamatorios, y pueden perpetuar y prolongar la respuesta de NF- $\kappa$ B, otros genes diana funcionan para suprimir y contener la respuesta inflamatoria causada. Tras ser sintetizada la proteína I $\kappa$ B, el regulador negativo de NF- $\kappa$ B, conserva el complejo de NF- $\kappa$ B en el citoplasma y previene su actividad transcripcional, creando así un ciclo de retroalimentación negativa (Bekhtat et al., 2017).

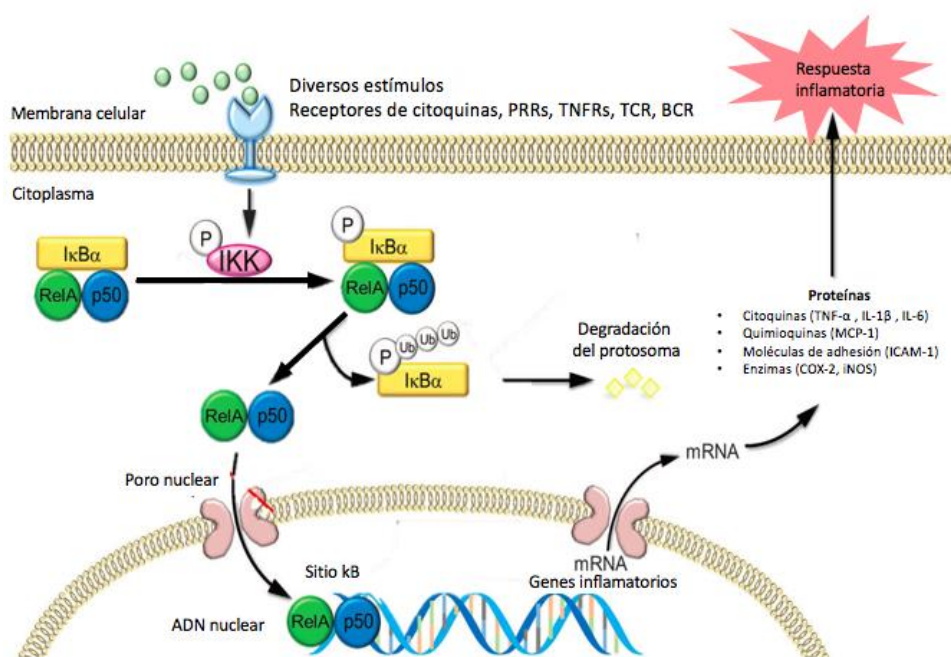
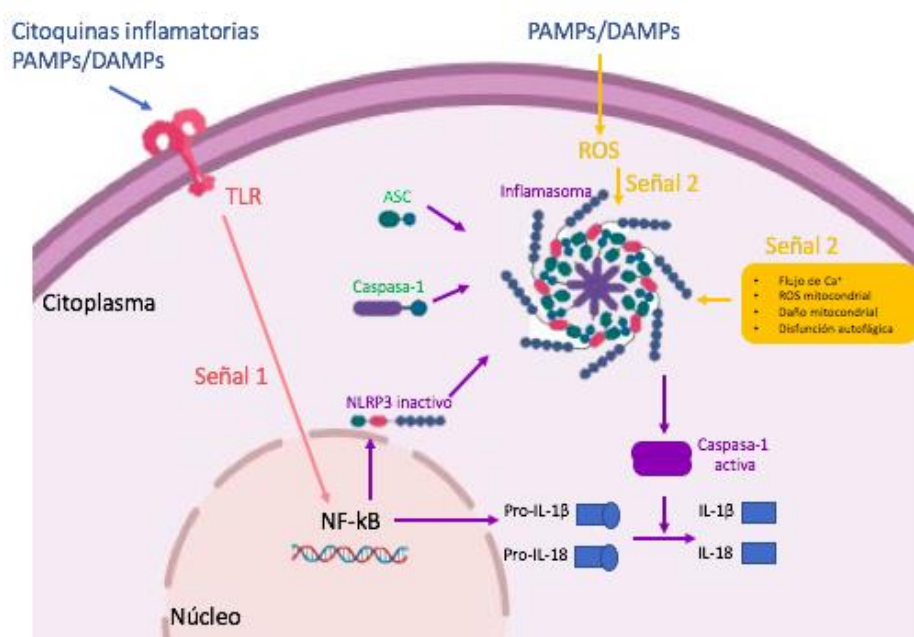


Figura 4. Señalización de NF- $\kappa$ B (Modificado de Liu et al., 2017)

#### 1.4.4.2 Inflamasoma NLRP3

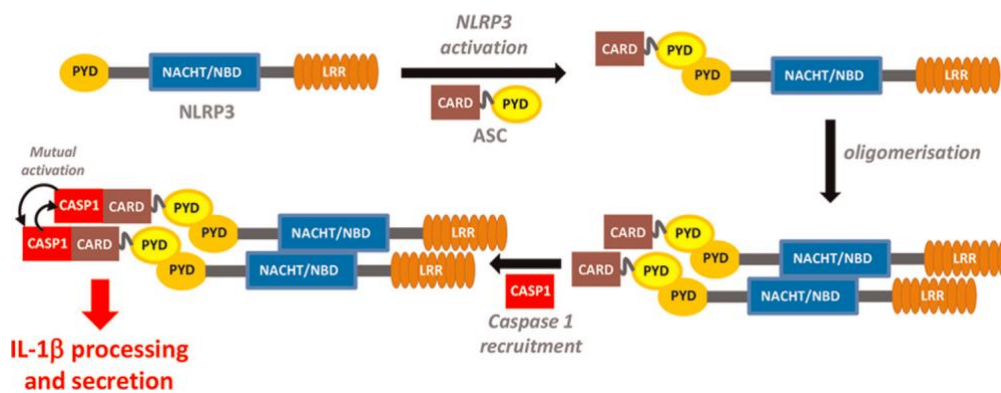
La producción de IL-1 $\beta$  por diversos tipos celulares está regulada críticamente por complejos moleculares citosólicos, denominados inflamasomas. Hasta la fecha se han descrito cinco diferentes complejos de inflamasomas NLRP1, NLRP2, NLRP3, AIM2 e IPAF/NLRC4 (Schroder y Tschopp, 2010; Minkiewicz et al., 2013), aunque existen otros miembros de la familia NLR identificados como NLRP6, NLRP7 y NLRP12, que pueden formar inflamasomas con ASC, pero sus ligandos aún se desconocen (Grenier et al., 2002; Wang L et al., 2002). Cada inflamasoma es activado en respuesta a un estímulo, la mayoría de ellos reconocen ciertos patógenos específicos; sin embargo, el inflamasoma NLRP3 puede ser activado por diversos estímulos inusuales, lo que convierte a NLRP3 en una estructura versátil e importante y con mayor implicancia en la respuesta inmunitaria innata (Abderrazak et al., 2015)

El inflamasoma NLRP3 es una maquinaria intracelular que forma parte de la respuesta inflamatoria. Por lo general, requiere una señal de cebado (señal 1) y una señal de activación (señal 2) (Fig. 5. La señal 1 induce la expresión transcripcional de NLRP3, pro-IL- $\beta$  y posiblemente desubiquitina a NLRP3 (Man y Kanneganti, 2015; He et al., 2016). Los inductores típicos de la señal 1 incluyen componentes bacterianos, tales como ligandos TLR, y citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , capaces de activar NF- $\kappa$ B. La señal 2 se desencadena por moléculas de estrés celular inducidas por PAMPs y DAMPs, LPS, ácidos nucleicos y ciertas toxinas formadoras de poros (Man y Kanneganti, 2015; Vanaja et al., 2015), que pueden provocar una respuesta inflamatoria a nivel endotelial, que se asocia con enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis, y con enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y obesidad (Man y Kanneganti, 2015). (Fig 5.)



**Figura 5.** Esquema de la activación del inflamasoma NLRP3 en la célula endotelial (Modificado de Shao et al., 2015).

Previamente a la activación, el inflamasoma NLRP3 está asociado a una proteína adaptadora, la cual contiene una estructura tripartita que consiste en un dominio de pirina (PYD), un dominio de unión a nucleótidos (NBD) y un dominio repetido rico en leucina (LRR) (Strowig et al., 2012). Tras la activación, NLRP3 se asocia con la proteína tipo punto asociada a apoptosis (ASC), que comprende un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) y un dominio de pirina (PYD) (De Alva, 2009). El complejo NLRP3-ASC oligomerizado se une a la cisteína-aspartato-proteasas específica 1 (caspasa-1). El complejo inflamasoma NLRP3 (NLRP3, ASC y caspasa-1) con la caspasa activa 1, escinde la pro-IL-1 $\beta$  y la pro-IL-18 y las vuelve en formas maduras (Gross et al., 2011), lo que lleva a la secreción de estas citoquinas pro-inflamatorias y a la muerte celular conocida como piroptosis (Zheng et al., 2011; Koka et al., 2017; Hoseini et al., 2018) (Fig 6).



**Figura 6.** Ensamblaje del inflamasoma NLRP3 (Abderrazak et al., 2015).

Algunos autores han propuesto tres potenciales mecanismos de activación de NLRP3, donde el flujo de potasio, el daño lisosomal y las señales de ROS, pueden ser capaces de inducir la liberación del ADN mitocondrial oxidado y luego activar la NLRP3 (Shimada et al., 2012). Sin embargo, otros proponen que las enzimas COX, lipoxigenasa (LPO) y NADPH oxidasa, así como la disfunción mitocondrial, participan en la producción de ROS y en la activación del inflamasoma NLRP3. Asimismo, los productos finales de glicación avanzada (AGEs) también regularían NLRP3, caspasa-1, y la expresión de IL-1 $\beta$  (Chen et al., 2017), sugiriendo que los AGEs podrían inducir un estrés oxidativo excesivo y desencadenar ROS a través de la señalización del inflamasoma NLRP3, lo que mediaría su capacidad de producir disfunción endotelial (Deng et al., 2018).

La expresión de NLRP3 se asocia con múltiples enfermedades, incluyendo desórdenes metabólicos, esclerosis múltiple, diabetes tipo 2, aterosclerosis, asma, enfermedades autoinmunes, artritis gotosa y enfermedades del sistema nervioso central (Strowig et al., 2012; Guo et al., 2015). Recientemente, un potente inhibidor selectivo del inflamasoma NLRP3, MCC950 (IC<sub>50</sub> 7,5 nM), se ha descrito como una alternativa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Coll et al., 2015).



#### 1.4.4.2.1 *NF- $\kappa$ B en la regulación del inflamasoma*

NF- $\kappa$ B es un mediador de la señal 1 de la activación del inflamasoma NLRP3, que actúa induciendo la expresión transcripcional de NLRP3 y pro-IL-1 $\beta$  en respuesta a diversos PRRs ligados y citoquinas. Las dianas directas de NF- $\kappa$ B son los genes pro-IL-1 $\beta$  y el NLRP3 que contienen sitios de unión a NF- $\kappa$ B contenidos en su región promotora (Qiao et al., 2012)

Por su parte, IKK $\beta$  juega un papel negativo en la activación del inflamasoma NLRP3, donde parece estar implicado en la inducción de autofagia, un sistema de degradación de proteínas anormales y organelas dañadas que se activa para mantener la homeostasis. A su vez, IKK podría regular negativamente la activación del inflamasoma, manteniendo mitocondrias sanas para prevenir la liberación de ROS, como mecanismo de autorregulación restringiendo la función pro-inflamatoria de NLRP3 (Zhong et al., 2016).

#### 1.4.4.3 *Marcadores y citoquinas inflamatorios*

Entre los marcadores inflamatorios asociados con la disfunción endotelial y la aterosclerosis destaca la capacidad intrínseca de las células vasculares activadas (endotelio y músculo liso) para secretar quimioquinas como IL-1, IL-8, MCP-1, factor estimulante de monocitos y granulocitos. Por otro lado, los linfocitos T y los monocitos/macrófagos secretan sus respectivas citoquinas como respuesta al reconocimiento de antígenos (Libby et al., 1986; Pober y Sessa 2007). Por su parte, en la fase aguda de la inflamación se libera la proteína C reactiva (CRP), una proteína inflamatoria inducida por la IL-6 (Libby y Ridker, 2006), la cual se deposita en la íntima y precede a la aparición de células inmunes como los monocitos (Torzewski et al., 2000). Estos últimos se infiltran en el espacio sub-endotelial y son capaces de incorporar lípidos para convertirse en células espumosas, las cuales liberan sustancias pro-inflamatorias que promueven la migración y diferenciación de las células musculares lisas vasculares (Woollard, 2013). Además, la CRP afecta directamente la biodisponibilidad de NO, causando estrés oxidativo, hiperplasia de la íntima y disfunción endotelial (Park K y Park W, 2015).

La secreción de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 es una consecuencia de la activación fagocitaria y promueve efectos metabólicos, fisiológicos, inflamatorios, hematológicos e inmunológicos. La excesiva o prolongada generación de IL-1 $\beta$  puede causar daño tisular asociada con numerosas inflamaciones agudas y crónicas, muchas de las cuales son autoinmunes (Dinarello, 2011; Leemans et al., 2011). Además, la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  promueven la adherencia y migración leucocitaria, e inducen a las células endoteliales y leucocitos a expresar VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, IL-6, E-selectina y P-selectina, lo que promueve la adhesión de neutrófilos, linfocitos y su trans migración al endotelio, resultando en inflamación y favoreciendo la disfunción endotelial (Clark et al., 2007; Cook-Mills et al., 2011; Freitas et al; 2015). Entre las proteínas expresadas, VCAM-1 ha sido implicada como marcador molecular de la disfunción endotelial, debido a que su isoforma soluble

en plasma circulante se correlaciona clínicamente con pacientes con aterosclerosis (Harrison et al., 2003).

Las células endoteliales se reprograman fenotípicamente de forma reversible frente a ciertas citoquinas pro-inflamatorias, alterando muchas propiedades funcionales vitales, lo que presumiblemente sirve como una respuesta adaptativa a estímulos potencialmente nocivos. La disfunción del endotelio, en el sentido más amplio, abarcaría diversas alteraciones no adaptativas en su fenotipo funcional normal, con implicaciones importantes en la regulación hemostática, trombosis, tono vascular, balance redox e inflamación (Gimbrone y García-Cardena, 2016), facilitando el desarrollo de la aterosclerosis (Naz et al., 2017).

### ***Interleuquina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )***

La IL-1 es un grupo de citoquinas del sistema inflamatorio sistémico y local, que tienen un papel patológico en una lista creciente de enfermedades. Actualmente se considera que IL-1 tiene un papel relevante en la fisiopatología de enfermedades como diabetes mellitus tipo 1 y 2 (DMT1 y DMT2) (Donath y Shoelson, 2011; Herder et al., 2015), aterosclerosis (Shikama et al., 2015), hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Krishnan et al., 2014; Ballak et al., 2015).

Hay dos genes relacionados de IL-1: IL1A e IL1B, que codifican IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente (Dinarello, 1996). El precursor de IL-1 $\alpha$  está constitutivamente presente en las células de individuos sanos y la función de IL-1 $\alpha$  está asociada a la inflamación estéril (Berda-Haddad et al., 2011), mientras que la IL-1 $\beta$  requiere una serie de eventos intracelulares antes de que la citoquina pueda desencadenar la inflamación. Tras estímulos microbianos, por otras citoquinas como el TNF, IL-18, IL-1 $\alpha$  o por la misma IL-1 $\beta$ , se puede inducir la transcripción de IL-1 $\beta$  (Dinarello et al., 1987), que se expresa en monocitos circulantes, macrófagos tisulares y células dendríticas (Dinarello, 2011).

La IL-1 $\beta$  desencadena cascadas de señalización intracelular a través de la activación del receptor de IL-1 tipo I (IL-1R1) (Dinarello, 1996). IL-1R1 se caracteriza por tener dominios similares a inmunoglobulinas extracelulares y al receptor Toll like/ interleukin-1R (TIR). Los receptores de IL-1 se heterodimerizan tras la unión de las citoquinas para ejercer la señalización intracelular y su activación dispara múltiples eventos secuenciales de fosforilación, que resultan en la activación de NF- $\kappa$ B (Palomo et al., 2015) y del terminal Jun NH2 de la proteína quinasa activada por mitógeno (JNK MAPK) (Maedler et al., 2009), ambas implicadas en la resistencia a la insulina (Shoelson et al., 2003). IL-1 $\beta$  también induce potencialmente la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias, incluida IL-6 (Yang et al., 2008), mediante la activación de JAK2 / STAT3, y también se asocia con la resistencia a la insulina (Ueki et al., 2004).

## 1.5 ENFERMEDADES CARDIOMETABÓLICAS

### 1.5.1 Obesidad

La obesidad es una patología del tejido adiposo, que implica una respuesta inflamatoria, y se debe a la incapacidad de los adipocitos para almacenar eficientemente el exceso de nutrientes y lípidos (Guilherme et al., 2008; Zeyda y Stulnig, 2009). Los dos principales factores que contribuyen a la disfunción del tejido adiposo son la acumulación de ácidos grasos no esterificados, con sus productos secundarios, y la hipoxia que se produce al expandirse el tejido adiposo (Matafome y Seiça, 2017). Al volverse disfuncional, estimula la angiogénesis y empieza a secretar una serie de sustancias de carácter inflamatorio, que pueden contribuir a la inflamación del tejido adiposo, a la resistencia a la insulina y a la disfunción endotelial (Naz et al., 2017f).

En la obesidad, el tejido adiposo inflamado secreta muchas sustancias biológicamente activas, denominadas adipoquinas o adipocitoquinas. Entre ellas, las citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 o CCL-2 que son liberadas por las células inflamatorias infiltradas en el tejido adiposo (Engin, 2017), siendo los macrófagos la principal fuente de secreción (Freitas et al., 2015), lo que favorece la resistencia a la insulina (Jung y Choi, 2014). En este proceso, TLR5/PI3K, AKT, JNK-AP1, IKK $\beta$  (inhibidor de NF- $\kappa$ B), juegan un papel importante afectando la función del endotelio vascular, ya que modulan la producción de NO, liberan ROS y permiten el reclutamiento de macrófagos y la activación del inflammasoma (Engin, 2017). Además, la obesidad induce un cambio en el fenotipo de los macrófagos, que cambian desde el tipo anti-inflamatorio M2 a el pro-inflamatorio M1, contribuyendo a la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad. (Yamaguchi y Yoshino, 2017).

### 1.5.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La DMT2 es una enfermedad metabólica debida en gran parte al desarrollo de resistencia tisular a los efectos de la insulina. La resistencia a insulina se define como la baja capacidad de esta hormona para estimular el consumo de glucosa en el músculo esquelético, una de cuyas consecuencias es la hiperglucemia. Además, la resistencia a la insulina está involucrada en la patogénesis de otras enfermedades metabólicas tales como la dislipidemia aterogénica, el síndrome metabólico, el hígado graso, así como en el desarrollo de enfermedades coronarias (Yamaguchi y Yoshino, 2017). Por otro lado, la DMT2 está asociada con la disminución de enzimas antioxidantes, como SOD y catalasa, así como de glutatión reducido y ácido ascórbico, lo que favorece que las ROS interactúen químicamente con el NO produciendo el deterioro de la vasodilatación (Khaddaj et al., 2017).

Un aspecto adicional de la DMT2 es la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , CRP, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 (Arnush, et al., 1998; Pradhan et al., 2001; Spranger et al., 2003; Hu et al., 2004; Alexandraki et al., 2006; Kolb et al., 2010; Nunemaker, 2016), que junto con los ácidos grasos libres actúan sobre algunos órganos como el hígado y el músculo esquelético,

modificando la respuesta inflamatoria, incrementando la síntesis lipídica y la gluconeogénesis (Boden, 1997). Además, los ácidos grasos libres acceden al hígado, incrementan sus niveles hepáticos y sirven como ligandos del complejo TLR4 que estimula la secreción de adipoquinas por los macrófagos (Suganami et al., 2005). Existen datos crecientes sobre la capacidad de todos estos mecanismos para inducir el síndrome metabólico, así como la resistencia a la insulina (Wang Y et al., 2005; Kim et al., 2007).

Asimismo, en la DMT2 se ha descrito la capacidad para originar AGEs, capaces de unirse a receptores específicos en la superficie de monocitos, macrófagos y células musculares lisas. Además, las AGEs se acumulan en la pared vascular, alterando la integridad estructural del endotelio y de la membrana basal e impidiendo la actividad del NO (Avogaro et al., 2008), lo que resulta en una respuesta inflamatoria, que incrementa la permeabilidad vascular y el estrés oxidativo (Park K y Park W, 2015).

### 1.6 ADIPOQUINAS

El tejido adiposo blanco ha dejado de ser considerado un órgano almacenador de energía en forma de triacilglicerol para tener un papel fisiológico y comportarse como una importante glándula endocrina, metabólica y un órgano regulador inmune. También se le atribuye la responsabilidad del consumo postprandial de glucosa y de ácidos grasos. El tejido adiposo, incluidos los adipocitos y los macrófagos residentes en este tejido, secretan un número de péptidos o proteínas bioactivas, colectivamente llamadas adipoquinas, las cuales están envueltas en una compleja señalización entre el tejido adiposo blanco y los sistemas inflamatorio, metabólico e inmunológico (Anderson et al., 2007). Así, regulan varias funciones fisiológicas, tales como el balance energético, la sensibilización a la insulina, la regulación del apetito, la respuesta inflamatoria y la homeostasis vascular, conjuntamente con otros órganos también capaces de liberar citoquinas, incluyendo el epitelio intestinal, la glándula adrenal, el músculo esquelético, leucocitos, macrófagos, hepatocitos y cardiomiocitos (Guerrero-García et al., 2016; Gualillo et al., 2007).

Diversas adipoquinas han sido descritas en múltiples procesos biológicos fisiológicos, entre los que cabe destacar (Blüher, 2014): (a) respuesta inmune (suero amiloide A3, proteína de simulación acilante y adiposina); (b) inflamación (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , CRP, MCP-1, resistina, progranulina y quemerina); (c) metabolismo de la glucosa (leptina, adiponectina, dipeptidilpeptidasa-4 ó DPP-4, FGF21, proteína de tipo angiopoyetina 8, resistina, vaspin); (d) sensibilidad a la insulina (leptina, adiponectina, quemerina, RBP4, omentin y visfatin); (e) secreción de insulina (apelina, nesfatin-1); (f) presión arterial (apelina y angiotensinógeno); (g) contractilidad miocárdica (proteína de unión a ácidos grasos- 4); (h) adhesión celular (activador del plasminógeno inhibidor-1); (i) crecimiento y función vascular (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)); (j) adipogénesis y morfogénesis ósea (BMP-4 y BMP-7); (k) crecimiento (factor de crecimiento similar a la insulina o IGF-1, TGF $\beta$  y fibronectina); (l) metabolismo lipídico (CD36

soluble y apelina); (m) acumulación de lípidos en el hígado (fetuín-A); y (n) regulación del apetito y la saciedad (p. leptina y vaspín).

La secreción de adipoquinas se puede ver alterada en procesos patológicos, como la obesidad, contribuyendo al desarrollo de enfermedades metabólicas e inflamatorias (Fasshauer y Blüher, 2015), tales como resistencia a la insulina, disfunción de células beta, disfunción endotelial y aterosclerosis, entre otras (Bulcão et al., 2006). Además, las adipoquinas pueden alterar la vía de la glucosa y la homeostasis de lípidos, contribuyendo a una respuesta inflamatoria asociada a la adiposidad, inflamación sistémica y riesgo de la enfermedad metabólica (Hauer, 2005; Halberg et al., 2008).

### 1.6.1 Papel de la IL-1 $\beta$ en obesidad

En la obesidad, los adipocitos hipertróficos y eventualmente necróticos se convierten en una fuente considerable de factores inflamatorios y/o contenidos celulares que desencadenan una respuesta inflamatoria en las células inmunes circundantes, principalmente en los macrófagos M1 (Vandanmagsar et al., 2011; Dalmas et al., 2014). Estos macrófagos liberan citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Stienstra et al., 2010; Strowig et al., 2012; Donath, 2014). Como ya se ha comentado previamente, estas citoquinas, y particularmente la IL-1 $\beta$ , promueven la resistencia a la insulina en adipocitos de animales obesos (Jager et al., 2007; Vandanmagsar et al., 2011). Asimismo, junto con las citoquinas pro-inflamatorias, los macrófagos CD11c+ y los componentes de inflammasoma NLRP3, se ha descrito que induce intolerancia a la glucosa y resistencia a insulina (Herder et al., 2009; Herder et al., 2013). Además, se ha observado que la estimulación de hepatocitos con IL-1 $\beta$  aumenta significativamente la acumulación de triglicéridos, lo que ha llevado a proponer que la señalización de IL-1 $\beta$  regula la lipogénesis hepática en la obesidad, y es esencial para la inducción de esteatosis hepática en ratones obesos (Herder et al., 2015).

### 1.6.2 Papel de IL-1 $\beta$ en diabetes mellitus

La IL-1 $\beta$  actúa como un promotor clave de la inflamación sistémica y tisular asociada a la diabetes mellitus (Dinarello et al., 2010; Sumpter et al., 2011). Estudios experimentales en modelos animales y ensayos clínicos en humanos sugieren que IL-1 $\beta$  desempeña un papel en la resistencia a la insulina, tanto en DMT2 como estados pre-diabéticos (van Asseldonk et al., 2011), asociadas a una sobreproducción de adipoquinas, incluida la IL-1 $\beta$ , que están relacionadas localmente con la inflamación del tejido adiposo (Peiró et al., 2017).

La IL-1 $\beta$  se ha implicado en la fisiopatología de la DMT2 (Dinarello et al., 2010), ya que su producción se incrementa en la propia célula  $\beta$  en presencia de altas concentraciones de glucosa (Maedler et al., 2002). De hecho, la expresión de IL-1 $\beta$  es hasta 100 veces superior en células  $\beta$  de pacientes con DMT2 que en controles (Dinarello, 2011). Por lo que, en condiciones

de hiperglucemia, la IL-1 $\beta$  facilita la entrada del exceso de glucosa, produciendo una exagerada respuesta de la señalización inflamatoria en las células vasculares (Lafuente et al., 2008; Azcutia et al., 2010). Parte del exceso de glucosa intracelular sigue la ruta de la pentosa fosfato para producir NADPH que a su vez activa a NADPH oxidasa y la consecuente sobreproducción de ROS (Peiró et al., 2016) y el desarrollo de aterosclerosis en el contexto de la vasculopatía diabética (Olukman et al., 2010; Gray et al., 2013).

Se ha observado que la IL-1 $\beta$  activa la NADPH oxidasa vascular y produce disfunción endotelial; además, un antagonista específico recombinante del receptor para IL-1 (IL-1Ra), como anakinra, mejora la disfunción endotelial en ratas diabéticas inducida por estreptozotocina y reduce el estrés oxidativo mediado por la activación de la enzima NADPH oxidasa (Vallejo et al., 2014). También se ha descrito que la eliminación genética de NLRP3 (Vandanmagsar et al., 2011), o la inhibición farmacológica de la caspasa-1 (Stienstra et al., 2010) pueden disminuir los niveles de IL-1 $\beta$ , otorgando protección contra la resistencia a la insulina inducida por la obesidad.

### 1.6.3 Papel de la IL-1 $\beta$ en aterosclerosis

Uno de los primeros pasos de la aterosclerosis es el reclutamiento de leucocitos por células endoteliales a través de la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Schreiber, 2002). Estudios recientes sugieren que los cristales de colesterol emergen en los primeros momentos de la aterogénesis, concurrentemente con la aparición de células inmunes en el espacio subendotelial (Dewell et al., 2010) y están asociados con la señalización defectuosa y la disfunción vascular (Schreiber, 2002). En efecto, la peroxidación lipídica promueve la formación de estructuras cristalinas de colesterol libre (Self-Medlin et al., 2009). En lesiones ateroscleróticas, los cristales de colesterol se encuentran no sólo fuera de las células sino también dentro de los macrófagos y activan el NLRP3 intracelular, un componente crítico en la producción de IL-1 activa mediada por caspasa-1 (Dewell et al., 2010; Rajamäki et al., 2010). De hecho, los cristales de colesterol inducen la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos (Menu et al., 2011), que se detecta en las lesiones ateroscleróticas (Ridker et al., 2011). Asimismo, datos preclínicos revelan que la IL-1 $\beta$  puede jugar un papel importante en la progresión y ruptura de placas ateroscleróticas (Chi et al., 2004; Chamberlain et al., 2006; Singla et al., 2016).

## 1.7 LA ADIPOQUINA VISFATINA/NAMPT

Inicialmente, Fukuhara et al. (2005) identificaron la visfatina como una adipoquina pleiotrópica de 52 kDa, expresada mayormente en el tejido adiposo abdominal y cuyos niveles plasmáticos se correlacionaban positivamente con la obesidad. De hecho, la visfatina se expresa en mayor cantidad en la grasa marrón que en la grasa blanca (Revollo et al., 2007; Wang et al., 2008), así como en otros tipos celulares (Chang et al., 2012) y se relaciona con trastornos metabólicos, como el síndrome metabólico, DMT2 y obesidad (Dahl et al., 2012).

Posteriormente, se demostró que la enzima nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt), también conocida como factor estimulante de colonias de células pre-B (PBEF) es idéntica a visfatina y, de hecho, la Human Gene Nomenclature (HUGO) y la Mouse Genomic Nomenclature han determinado el nombre oficial del gen y de la proteína como Nampt (Garten et al., 2009).

La visfatina/Nampt se encuentra tanto intracelular como extracelularmente, pero no está clara su forma y configuración en ambas ubicaciones. La isoforma intracelular Nampt (iNampt) tiene actividad enzimática, utilizando adenosina trifosfato como activador y cataliza la condensación de nicotinamida con 5-fosforribosil-1-pirofosfato para producir mononucleótido de nicotinamida (NMN) (Martin et al., 2001). A su vez, NMN se convierte a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) por la enzima NMN-adenililtransferasa (Nmnats) (Carbone et al., 2017). La actividad enzimática de Nampt es en gran parte debido a su forma dimérica (Wang T. et al., 2006; Burgos et al., 2013) ocurre en el citosol y núcleo, y también en las mitocondrias (Pittelli et al., 2010) y su importancia es alta en la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>, una coenzima universal y esencial que participa en múltiples reacciones enzimáticas (Yamaguchi y Yoshino, 2017). Visfatina/Nampt modula reacciones celulares redox, regula los grupos NAD<sup>+</sup> y NADH y la actividad de las enzimas dependientes de NAD<sup>+</sup>, incluyendo sirtuinas y poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) (Galli et al., 2013). Por tanto, la actividad de Nampt está involucrada en el metabolismo y la supervivencia celular, en la biogénesis mitocondrial y en la respuesta adaptativa frente a estrés celular (Garten et al., 2015).

La isoforma extracelular (eNampt) puede actuar como un factor de crecimiento, como una citoquina (Koumaki y Dalamaga, 2012) y como una enzima (Revollo et al., 2007; Wang et al., 2008), pero su verdadero mecanismo de secreción y funciones fisiológicas aún se debaten (Carbone et al., 2017). Sin embargo, se sabe que eNampt presenta propiedades proliferativas, anti-apoptóticas, pro-inflamatorias, pro-angiogénicas y metastásicas (Dalamaga et al., 2018). La visfatina/Nampt se expresa en linfocitos, adipocitos, neutrófilos y fibroblastos, estimula a los leucocitos humanos e induce la producción de citoquinas inflamatorias, tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Moschen et al., 2007; Lee et al., 2009); además, induce la expresión de MMP-2 y MMP-9 (Adya et al., 2007) asociadas con placas ateroscleróticas (Wang X. et al., 2016). Asimismo, su efecto pro-angiogénico se debe a la capacidad de inducir a la proteína MCP-1 y al receptor C-C quimioquina receptor-2 (CCR-2) en monocitos (Adya et al., 2009).

Se ha descrito que la visfatina/Nampt derivada del tejido adiposo perivascular puede actuar a través de su actividad enzimática como factor de crecimiento sobre las VSMC, lo que indica que visfatina/Nampt puede regular la función vascular de una manera endocrina y paracrina (Wang et al., 2008, Burgos, 2011). Además, se ha propuesto que la expresión de eNampt en monocitos y macrófagos activados (Wang S. et al., 2016) y en los adipocitos de la grasa visceral, especialmente de la grasa perivascular de la aorta o la arteria coronaria (Ajuwon y Spurlock, 2005), inicia la inflamación endotelial de la arteria y promueve la disfunción endotelial

coronaria que permite el progreso de la aterosclerosis (Shi K. et al., 2016). Adicionalmente, Vallejo et al. (2011) han demostrado que la visfatina/Nampt deteriora las relajaciones dependientes del endotelio en microvasos mesentéricos, tanto de rata como humanos, a través de su actividad enzimática Nampt y la producción de ROS por la enzima NADPH oxidasa.

### 1.7.1 El gen y la proteína Nampt

El gen para Nampt humano fue clonado por primera vez a partir de la biblioteca de ADN complementario (ADNc) de un linfocito de sangre periférica. El gen está localizado en el cromosoma 7, posición 22 del brazo largo (7q22), abarca una longitud de 36.908 pb, está compuesto de 11 exones y 10 intrones y se traduce en una proteína de 491 aminoácidos que varía entre 52 a 57 kDa (Kitani et al., 2003; Wang T et al., 2006; Kim et al., 2006). eNampt presenta un peso molecular ligeramente más alto que iNampt (Revollo et al., 2004). El gen Nampt está expresado en todos los tejidos y su secuencia de codificación está altamente conservada evolutivamente y compartida hasta un 95% entre especies de mamíferos como el ratón y el hombre, pero también con procariontes e insectos (Luk et al., 2008, Koumaki y Dalamaga, 2012; Martin et al., 2001). Tanto iNampt como eNampt se someten a modificaciones postraduccionales para su secreción y activación en adipocitos. Por ejemplo, la sirtuina1 (SIRT1) desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> desacetila a iNampt en Lys53 mejorando su secreción y actividad (Yoon et al., 2015). Mientras que en la secreción de eNampt participan las histonas desacetilasas dependientes de Zn y de sirtuinas, las cuales suprimen el inhibidor de eNampt tricostatina A para su posterior liberación (Pillai et al., 2012).

### 1.7.2 Mecanismos de secreción de visfatina/Nampt

Como se ha mencionado anteriormente, Nampt está expresado ubicuamente en varios tejidos; sin embargo, no todos los tipos celulares que la expresan pueden secretar Nampt al espacio extracelular. Como ejemplo, las células del músculo liso vascular expresan Nampt, pero no la pueden liberar (Wang et al., 2008). Nampt se puede liberar de otros tipos celulares, incluidos los adipocitos (Revollo et al., 2007; Wang et al., 2008), hepatocitos (Garten et al., 2010), leucocitos (Friebe et al., 2011), monocitos (Schilling y Hauschildt, 2012), células  $\beta$  (Kover et al., 2013), cardiomiocitos (Pillai et al., 2012), células endoteliales (Romacho et al., 2013b) y varios tipos de células nerviosas (Zhao Y et al., 2014). Se considera que la Nampt circulante proviene principalmente de adipocitos, leucocitos y hepatocitos, mientras que el mecanismo de secreción de Nampt todavía no está muy claro (Wang y Miao, 2015).

#### 1.7.2.1 *iNampt*

La enzima Nampt tiene 4 sustratos; nicotinamida y ácido de nicotinamida (2 formas distintas de la vitamina B3), triptófano y ribósido de nicotinamida (Burgos, 2011). La isoforma iNampt cataliza el paso limitante en la ruta de biosíntesis de NAD<sup>+</sup> a partir de nicotinamida (Carbone et al., 2017). iNampt se expresa en el corazón humano, placenta, cerebro, pulmones,

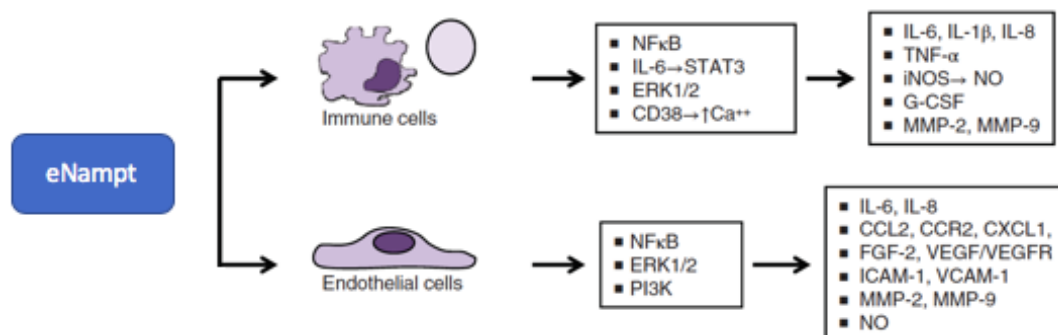


hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas (Samal et al., 1994) y se encuentra principalmente en el espacio núcleo-citosólico (Yang et al., 2007; Pittelli et al., 2010). Cabe mencionar que el compartimento mitocondrial alberga los complejos enzimáticos que requieren la coenzima NAD<sup>+</sup>, clave en procesos biológicos como la supervivencia celular, el ciclo del ácido cítrico, la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones (Galli et al., 2010).

### 1.7.2.2 eNampt

Esta forma extracelular es aproximadamente el 1% de la Nampt total (Grolla et al., 2015) y muestra un ritmo diurno, alcanzando su punto máximo a primera hora de la tarde (Benedict et al., 2012). La eNampt es secretada por varios tipos celulares, incluidos los adipocitos, leucocitos, hepatocitos y cardiomiocitos (Rongvaux et al., 2002; Garten et al., 2009; Garten et al., 2010; Pillai et al., 2012). Puede detectarse actividad enzimática Nampt en la circulación humana (plasma o suero) y en muchos entornos extracelulares (Kitani et al., 2003; Li et al., 2008) como el líquido cefalorraquídeo y sinovial, plasma seminal y en sobrenadantes de diferentes tipos celulares (Adeghate, 2008; Soncini et al., 2014). Se ha observado que en condiciones patológicas como la muerte celular, inflamación, necrosis, apoptosis e isquemia, los niveles de ATP pueden aumentar en el espacio extracelular, esto podría favorecer la actividad enzimática de eNampt a nivel extracelular (Garten et al., 2015). Además, es posible que eNampt, al carecer de péptido señal o un sitio de escisión para caspasa-1, se libere en el plasma a través de lisis o muerte celular (Montecucco et al., 2013) o mediante una vía no clásica como los exosomas y las microvesículas (Tanaka y Nabeshima, 2007; Grolla et al., 2015).

Frente a diversos estímulos, como estrés oxidativo, señales nutricionales, citoquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF) o frente a LPS, las células secretan eNampt (Ognjanovic et al., 2005; Pillai et al., 2012; Jing et al., 2014; Zhao Y et al., 2014). La secreción de visfatina/Nampt inducida por IL-1 $\beta$  también se ha descrito en células endoteliales humanas (Villalobos et al., 2014). Además, se ha descrito que eNampt puede activar las vías de señalización intracelular en pocos minutos (Soncini et al., 2014), sugiriendo una potencial unión a un receptor de superficie celular. Sin embargo, aun no se ha identificado este posible receptor (Carbone et al., 2017).



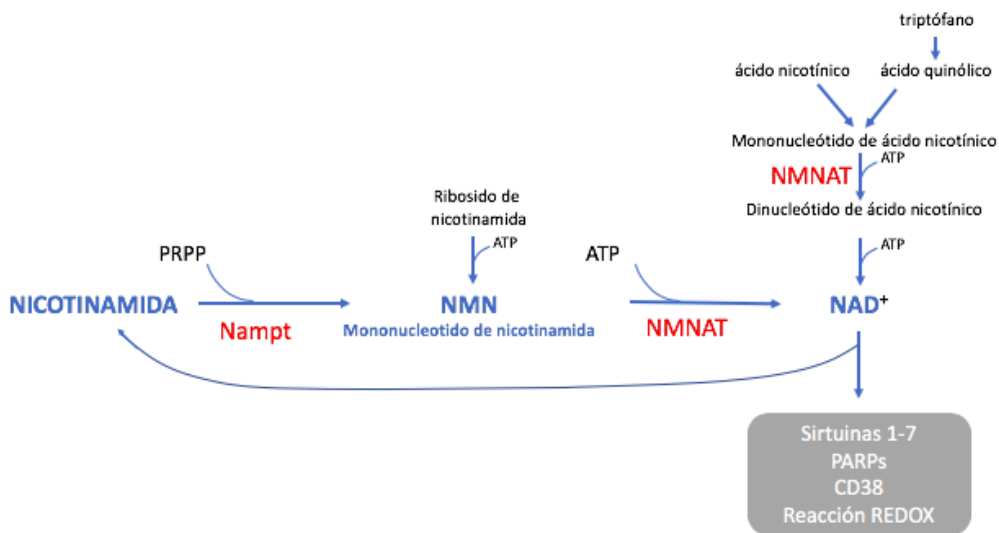
**Figura 7.** Efectos autocrinos y paracrinos de eNampt procedentes de las células endoteliales y las células inmunes (Modificado de Carbone et al., 2017).

1.7.3 Nampt y la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup> es un dinucleótido esencial que no solo actúa como cofactor de oxidación-reducción del sistema redox en el metabolismo celular, sino también sirve como nucleótido señal regulador de la expresión genética, reparación del ADN, integridad del genoma, función mitocondrial y apoptosis (Watson et al., 2017; Dalamaga et al., 2018).

Hay dos vías conocidas en la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>: la vía clásica a partir del ácido quinólico y triptófano, este último se cataboliza en NAD<sup>+</sup> a través de la vía cinurenina por medio de ocho reacciones enzimáticas en el hígado, cerebro y tejidos inmunes (Heyes et al., 1997), y la vía alterna a partir de la nicotinamida y ácido nicotínico (Dahl et al., 2012), donde Nampt cataliza el paso limitante de la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>, convirtiendo la nicotinamida en NMN (Revollo et al., 2004; Shackelford et al., 2013). La enzima nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (Nmnat) localizada en el núcleo, citosol y mitocondria, cataliza la conversión de NMN a NAD<sup>+</sup> en presencia de ATP (Yamaguchi y Yoshino, 2017).

La nicotinamida es el precursor más importante porque se genera por enzimas consumidoras de NAD<sup>+</sup> tales como NADPH oxidasa, PARP, CD38, y siete tipos de sirtuina (sirt1 a sirt7) (Yamaguchi y Yoshino, 2017). Estas enzimas regulan la biodisponibilidad de coenzimas indispensables en el metabolismo energético, como NAD<sup>+</sup> (la forma oxidada) y NADH (la forma reducida), y son capaces de neutralizar el estrés oxidativo intracelular (Belenky et al., 2007; Chiarugi et al., 2012). En general, la vía alterna de Nampt es más eficiente y más rápida que la vía clásica de la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>, al menos en mamíferos (Revollo et al., 2004).



**Figura 8.** Vías de biosíntesis de NAD<sup>+</sup> en mamíferos (Modificado de Yamaguchi y Yoshino, 2017).

1.7.4 Posible implicancia del TLR4 en la activación de visfatina/Nampt

Los TLRs son receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos conservados (Akira y Takeda, 2004; Suresh y Mosser, 2013). Estímulos como la producción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, NO u otros (Rhoads et al., 2017), permiten la expresión de TLR en las células del sistema inmune innato (células mieloides y NK). Tras su activación, se produce una respuesta inflamatoria asociada con la formación del inflamasoma (Martinon et al., 2002).

TLR4 es el primero de este tipo de receptores identificado en mamíferos (Miyake et al., 2007) y puede ser activado por LPS, así como por moléculas no infecciosas derivadas del huésped como DAMPs, muchos de los cuales están presentes en la hipertensión como consecuencia del daño crónico y muerte celular (McCarthy et al., 2013). Algunos compuestos circulantes que actúan como DAMPs, tras ser reconocido por los TLRs, por ejemplo la Ang II, pueden activar la vía NF- $\kappa$ B/JNK y las células T, lo que produciría la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y pro-oxidantes, favoreciendo el aumento de la presión arterial y dando lugar a más daño vascular (Hernanz et al., 2015), lo que a su vez aumentaría la liberación de DAMPs, creando un bucle de retroalimentación positiva y manteniendo la hipertensión (Harrison, 2014; Schiffrin, 2014).

Aunque visfatina/Nampt no es la única molécula que puede unirse y activar a TLR4, puede actuar como una molécula inmunitaria innata endógena capaz de unirse directamente y activar este receptor en ausencia de infección bacteriana y de cofactores, delineando así una nueva dimensión para la inducción de inflamación y respuestas de inmunidad innata por mecanismos no infecciosos (Camp et al., 2015). TLR4 también se expresa en las células del sistema cardiovascular y se ha propuesto que su activación contribuye a las patologías inflamatorias de la pared vascular, como la aterosclerosis, diabetes o el síndrome metabólico (Wijnand et al., 2010; Jialal et al., 2014).

Dependiendo del tipo de estímulo, la activación de TLR4 conduce a varias señales. A través de diferentes proteínas adaptadoras, principalmente MyD88, puede activar a NF- $\kappa$ B, controlando la transcripción de diferentes genes pro-inflamatorios (Sassá et al., 2009; Kawai y Akira, 2010). Otra vía de señalización es la cascada MAPK, mediante la vía dependiente de MyD88 (Carpenter et al., 2009). En definitiva, TLR4 se ha convertido en un objetivo farmacológico para contrarrestar las enfermedades relacionadas con su señalización (Hernanz et al., 2015).

### 1.7.4.1 *Visfatina/Nampt en obesidad*

Como se ha indicado, la visfatina/Nampt se describió inicialmente en pacientes con obesidad (Fukuhara et al. 2005). Esta adipoquina está regulada en los adipocitos bajo condiciones hipóxicas (Segawa et al., 2006) y es secretada a través de una vía no clásica por diferentes tipos de adipocitos, incluidas las líneas celulares de pre-adipocitos, así como adipocitos humanos primarios (Revollo et al., 2007; Olarescu et al., 2012), reforzando el papel del tejido adiposo como una de las principales fuentes de eNampt (Garten et al., 2015).

Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que hay un incremento de la expresión del ARNm de visfatina/Nampt durante la adipogénesis (Kralisch et al., 2005) y que su estimulación se debe a factores inductores de resistencia a la insulina, como IL-6, dexametasona, hormona del crecimiento, TNF- $\alpha$  e isoproterenol (Kralisch et al., 2005b; Kim et al., 2014).

Además, la glucosa y las LDL oxidadas estimulan la expresión de visfatina/Nampt a través de la vía PI3-quinasa-AKT (Haider et al., 2006; Haider et al., 2006b, Chen et al., 2013).

Además, se ha observado que individuos obesos pueden modular la expresión y producción de Nampt y/o su liberación. A nivel genético, se ha descrito que el gen Nampt tiene un número de SNPs asociados con la obesidad (Blakemore et al., 2009) y comorbilidades relacionadas como la enfermedad coronaria (Saddi-Rosa et al., 2013). La relevancia de las variaciones genéticas en Nampt en el desarrollo de la enfermedad puede depender de si el sitio activo, el ensamblaje del dímero activo o la expresión de Nampt están afectados (Garten et al., 2015). Por todo ello, se sugiere que la expresión de los genes y proteínas Nampt estarían alterados en la obesidad y los trastornos relacionados con esta enfermedad (Salgado-Delgado et al., 2013).

### *1.7.4.2 La visfatina/Nampt en diabetes mellitus*

Varios estudios han informado que los pacientes con DMT2 presentan altos niveles de eNampt comparado con controles sanos (Chen et al., 2006; El-Mesallamy et al., 2011) y por lo general están asociados con otras complicaciones de la diabetes mellitus, como la disfunción endotelial, la nefropatía diabética y el deterioro del metabolismo de los lípidos (Hajianfar et al., 2012).

Diferentes factores metabólicos han sido identificados como moduladores de la expresión de eNampt. En ratas, se ha observado que la pérdida del ritmo circadiano altera su expresión y la de otros genes metabólicos (Salgado-Delgado et al., 2013), que contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico y al deterioro del metabolismo de la glucosa (Benedict et al., 2012). La eNampt participa en la regulación de la secreción de insulina estimulada por la glucosa en los islotes pancreáticos (Revollo et al., 2007). Además, la eNampt se ha identificado como un potencial predictor de diabetes con una tasa de probabilidades combinada de 1.981 (IC 95%) (Chang et al., 2011). Finalmente, diferentes SNPs en el gen de Nampt han sido asociados con diabetes y complicaciones metabólicas relacionadas (Saddi-Rosa et al., 2013; Motawi et al., 2014).

### *1.7.4.3 La visfatina/Nampt en la aterosclerosis*

Se ha descrito que la eNampt puede ser secretada por la grasa perivascular y por varios subconjuntos celulares involucrados en la aterosclerosis, sugiriendo su acción paracrina en el desarrollo de la placa aterosclerótica (Spiroglou et al., 2010; Wang et al., 2008). Además de promover la inflamación, la eNampt contribuye a la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica manteniendo la degradación de la matriz extracelular y la angiogénesis (Carbone et al., 2017). Por otro lado, la eNampt puede actuar como un factor de crecimiento con efectos proliferativos en las células endoteliales y musculares lisas vasculares (Carbone et al., 2017), mediante la

secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y su receptor (VEGFR-2) (Adya et al., 2007; Kim S et al., 2007). Otros factores pro-angiogénicos incluyen a MCP-1 y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (Adya et al., 2007; Bae et al., 2009).

Asimismo, la eNampt es capaz de activar la NADPH oxidasa y NF- $\kappa$ B, así como los monocitos y macrófagos (Fan et al., 2011). Estos últimos aumentan la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$  e IL-8 (Dahl et al., 2007), contribuyendo a la disfunción endotelial (Konior et al., 2014). Las vías de señalización en las que participa visfatina/Nampt están involucradas en respuestas inflamatorias, tales como la transducción de la señal y activación de la transcripción de fosfatidilinositol 3 cinasa y fosfoquinasa activadas por mitógenos (MAPK) (Adya et al., 2007; Lee et al., 2009) y, mediante la activación NF- $\kappa$ B, incrementan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 que contribuyen directamente a la disfunción endotelial (Kim et al., 2008).

## 1.8 PERSPECTIVAS DE INTERFERENCIA FARMACOLÓGICA

### 1.8.1 Agente antioxidante: Apocinina

La apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) es un compuesto orgánico natural estructuralmente relacionado con la vainillina, por lo cual también es conocida como acetovanilona. Originalmente se extrajo de la raíz de la planta herbácea perenne *Apocynum cannabinum* (*Cáñamo canadiense*), y luego de la raíz de *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae) nativa de Himalayas (Van den Worm et al., 2001; Stefanska y Pawliczak, 2008; Touyz, 2008).

La apocinina ha sido utilizada experimentalmente como un agente antioxidante durante acciones que incluyen la inhibición de la actividad de NADPH oxidasas y la eliminación de ROS (Heumüller et al., 2008; Altenhöfer et al., 2015). Según sucesivas investigaciones farmacológicas en líneas celulares y modelos animales, apocinina ha demostrado ser un fitoquímico bioactivo con potencial antioxidante y propiedades anti-inflamatorias (Kinoshita et al., 2013).

Estudios previos proponen a este agente como un inhibidor selectivo del ensamblaje Nox-2, capaz de oxidar los grupos tioles de la enzima NADPH oxidasa (Chen et al., 2016) Sin embargo, Heumüller et al., (2008) han descrito que la apocinina es un inhibidor no selectivo de ROS, y podría actuar en los leucocitos como inhibidor de la NADPH oxidasa, mientras que en las células vasculares sería antioxidante directo, inhibiendo la señalización inducida por ROS. En animales de experimentación, se ha observado que la apocinina podría regular negativamente la expresión de NLRP3 y del inhibidor de la proteína apoptótica ligada al X (XIAP), y así aliviar la fibrosis renal en ratas con nefropatía diabética (Xin et al., 2018). Además, en ratas diabéticas puede atenuar el dolor neuropático al desacelerar la patogénesis mediada por el estrés oxidativo (Olukman et al., 2018), previniendo el aumento de la expresión de Nox, la disminución de la SOD, y la reducción de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhao W et al., 2014).

En condiciones isquémicas, la apocinina ejerce efectos protectores cardiovasculares (Chen et al., 2016). Además, la combinación de NADPH y apocinina inhiben significativamente la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 nuclear, así como la expresión de los genes para COX-2 e iNOS (Qin et al., 2017). También suprime la expresión de proteínas inflamatorias, incluidas NLRP3, ASC, caspasa-1, IL-1 $\beta$  e IL-18, en la corteza isquémica del cerebro (Qin et al., 2017). Esta combinación de NADPH y apocinina puede producir una mayor protección contra el daño isquémico, probablemente por la regulación negativa de NF- $\kappa$ B y la consecuente inhibición de la activación del inflammasoma NLRP3 (Qin et al., 2017). Sin embargo, se ha observado que algunos efectos de la apocinina en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* no podrían depender de la inhibición de Nox *per se* (Aldieri et al., 2008). Es posible que la acción de la apocinina se deba, en parte, a la captación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de la inhibición selectiva de la NADPH oxidasa (Johnson et al. 2002).

A pesar de las controversias sobre su selectividad, la apocinina ha sido utilizada como uno de los fármacos más prometedores en modelos experimentales de inflamación y enfermedades neurodegenerativas (Petrônio et al., 2013). Se ha observado que la apocinina no actúa como un inhibidor competitivo para el sustrato o cofactores en cualquiera de las subunidades de NADPH oxidasa, sino más bien interfiere con el proceso de ensamblaje de la oxidasa, donde se requiere al menos la activación de Nox-1 y Nox-2 (Stolk et al., 1994). Por otro lado, la apocinina reacciona rápidamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de peroxidasa, lo cual podría ser una nueva vía para agotar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto podría ser relevante para su aplicación como inhibidor de Nox-4, ya que esta isoforma produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y no anión superóxido (Petrônio et al., 2013). Además, la apocinina necesita ser oxidada por peroxidasa para pasar a diapocinina, su forma oxidante activa. Específicamente, los efectos de la apocinina oxidan la posición cisteína de p47phox, un componente citosólico de la NADPH oxidasa que se activa a través de la fosforilación por la proteína quinasa C, que a su vez, inhibe la asociación del componente de subunidad de membrana p22phox de NADPH oxidasa y, por lo tanto, inhiben el ensamblaje de Nox-2 y la posterior liberación de superóxido, disminuyendo así el estrés oxidativo y el daño tisular (Stefanska y Pawliczak, 2008; Mora-Pale et al., 2012).

Aunque estudios preclínicos han proporcionado que al inhibir Nox-1 y Nox-2, la apocinina reduce los parámetros en la hipertensión, diabetes y aterosclerosis (Drummond y Sobey, 2014). La administración a corto plazo de apocinina para los humanos parece ser bien tolerado y efectivo en reducir la producción de ROS, pero no están claros los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos de apocinina para la administración a largo plazo (Drummond y Sobey, 2014).

### 1.8.2 Antagonista del receptor TP: SQ 29,548

El compuesto SQ 29,548 es un ácido [1S-[1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  (Z),3 $\alpha$ , 4 $\alpha$ ]-7-[3-[[2-[(fenilamino) carbonil] hidrazino] metil]-7-oxabicyclo[2.2.1] hept-2-yl]-5-heptanoico), potente antagonista del receptor del tromboxano A<sub>2</sub> (TP) (Ogletree et al., 1985). La activación TP se ha visto involucrada

en diversas patologías, debido a que los prostanoideos vasoconstrictores derivados de la COX, como tromboxano (TXA<sub>2</sub>). Los TP juegan un papel importante en el inicio de la disfunción endotelial en enfermedades como diabetes, hipertensión (Debreczeni et al., 2013; Sun et al., 2017), aterotrombosis, aterosclerosis (Huang et al., 2016), envejecimiento vascular (Meyer et al., 2015) y otras enfermedades cardiovasculares (Alfranca et al., 2006).

En la DMT2, las isoformas de COX están implicadas en la disfunción vascular (Solini et al., 2016), con un incremento de la producción de TXA<sub>2</sub> debido a la disfunción de la prostaciclina sintasa (Zou et al., 2002; Du et al., 2006). En ratas diabéticas e hipertensas, se ha observado que la hiperglucemia es capaz de activar el TP y aumentar la presión arterial a través de la supresión del mecanismo Akt-eNOS endotelial, necesario para la activación de eNOS, lo que favorece la disfunción endotelial vascular y contribuye a la hipertensión, siendo este efecto antagonizado por SQ 29.548 (Sun et al., 2017).

También se ha observado que la administración de SQ 29,548 reduce significativamente la respuesta miogénica en la pared vascular venosa de la rata, así como las respuestas vasoconstrictoras inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o por el ácido araquidónico (Debreczeni et al., 2013). En ratones con diabetes tipo 2, el SQ 29,548 potencia la relajación vascular dependiente de endotelio (Solini et al., 2016). Algo similar se ha observado en vasos humanos, en los que SQ 29,548 reduce la vasoconstricción de arteriolas coronarias inducida por U-46619, un análogo a TXA<sub>2</sub> (Feng et al., 2011). Asimismo, SQ 29,548 puede revertir la disfunción endotelial observada en ratas sometidas a un aumento del estrés (Carda et al., 2015).

### 1.8.3 Inhibidor del inflamasoma NLRP3: MCC950

MCC950 es un nuevo inhibidor potente y altamente selectivo de la activación canónica y no canónica del inflamasoma NLRP3, con efectos inhibitorios *in vitro* e *in vivo* (Coll et al., 2015; Perera et al., 2018). MCC950 es un compuesto que contiene diarilsulfonilurea, que inicialmente mostró su capacidad de bloquear la oligomerización de ASC e inhibir la activación específica del inflamasoma NLRP3 (Ye et al., 2017).

El mecanismo de acción inhibitorio de MCC950 contra NLRP3, es mediante la vía de activación de IL-1 $\beta$  e inducción de piroptosis, por lo que se inhibe la activación canónica de la caspasa-1 y la activación no canónica de la caspasa-11, sin verse afectado el flujo de salida de K<sup>+</sup>, de Ca<sup>2+</sup> o las interacciones NLRP3-NLRP3 o NLRP3-ASC (Coll et al., 2015). Recientemente, se ha descrito un nuevo componente del inflamasoma NLRP3 llamado NEK7, que es una serina-treonina quinasa reguladora de la activación del inflamasoma NLRP3 (He et al., 2016b; Shi H et al., 2016), por lo que se ha sugerido que la interacción NEK7-NLRP3 podría ser el objetivo de inhibición por parte de MCC950 (Van Hauwermeiren y Lamkanfi, 2016; Perera et al., 2018).

En ensayos *in vitro*, se ha observado que MCC950 mejora las relajaciones dependientes de endotelio de segmentos aórticos procedentes de ratones diabéticos (Zhang et al., 2017), así como la sensibilidad a la insulina en ratones db/db (Zhai et al., 2018). Además, se ha descrito que MCC950 suprime significativamente la liberación de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, quimioquina MIP1- $\alpha$  y NO en explantes de ratones con colitis crónica (Perera et al., 2018).

En modelos animales, MCC950 redujo la producción de IL-1 $\beta$  por leucocitos aislados de pacientes con el síndrome de Muckle-Wells, caracterizado por mutaciones en el gen NLRP3 (Coll et al., 2015). Además, la inhibición del inflammasoma NLRP3 en cerdos con infarto de miocardio redujo el tamaño del infarto y preservó la función cardíaca (Van Hout et al., 2016). Por otra parte, la administración de MCC950 en ratones con lesiones cerebrales mejora significativamente la función neurológica, reduce el edema cerebral, inhibe las caspasa-1 e IL-1 $\beta$  y protege contra la activación pro-apoptótica mediada por la PARP y la caspasa-3 (Ismael et al., 2018).

Además, MCC950 muestra un potencial terapéutico prometedor para reducir la fibrosis renal en ratones inducida por cristales (Ludwig-Portugall et al., 2016), así como para revertir la inflamación y la presión arterial en un modelo de ratón hipertenso (Krishnan et al., 2016). Sin embargo, MCC950 no reduce la hipertensión inducida por Ang II (Dinh et al., 2017) debido al papel limitado del inflammasoma NLRP3 en este modelo de enfermedad (Perera et al., 2018).

MCC950 es el inhibidor de NLRP3 más específico y bien caracterizado que se conoce hasta la fecha y se ha probado en una amplia gama de enfermedades inflamatorias (Perera et al., 2018). Por tanto, la inhibición de NLRP3-inflammasoma puede tener potencial terapéutico en pacientes con enfermedades inflamatorias (Van Hout et al., 2016).

### 1.8.4 Antagonista del receptor IL-1: Anakinra

Debido a la implicación de IL-1 $\beta$  en una amplia variedad de enfermedades como diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares, se han desarrollado inhibidores de IL-1 como nuevas herramientas terapéuticas. Hasta ahora, se han aprobado tres agentes: anakinra (antagonista del receptor de IL-1), rilonacept (receptor soluble que inhibe IL-1) y canakinumab (anticuerpo monoclonal que neutraliza IL-1 $\beta$ ). Además, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de IL-1 y un anticuerpo neutralizante anti-IL-1 $\alpha$  se encuentran en ensayos clínicos (Dinarello et al., 2012).

Anakinra es un recombinante no glicosilado de acción corta, con forma del inhibidor natural IL-1Ra, capaz de bloquear la actividad de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . En el 2001, anakinra fue aprobada por primera vez para el tratamiento de la artritis reumatoide (Dinarello et al., 2012) y debido a su excelente historial de seguridad, corta vida media y múltiples vías de administración



sus indicaciones clínicas se han extendido para contrarrestar otras enfermedades inflamatorias (Jesus y Goldbach-Mansky, 2014). Asimismo, en pacientes diabéticos se ha descrito que la administración de anakinra regula la glucemia y la función secretora de las células beta del páncreas productoras de IL-1 $\beta$  (Larsen et al., 2007).

En modelos animales con infarto agudo del miocardio, la administración de anakinra mejora significativamente el proceso de remodelado ventricular mediante la inhibición de la apoptosis de los cardiomiocitos, lo que sugiere una acción cardioprotectora del antagonista del receptor de IL-1 para la isquemia cardíaca (Abbate et al., 2008). El bloqueo de la actividad de IL-1 produce una reducción rápida y sostenida de la gravedad de la enfermedad, por lo que este enfoque puede ser eficaz en el tratamiento de enfermedades como la insuficiencia cardíaca posterior al infarto (Dinarello et al., 2012).

Por otro lado, Vallejo et al. (2014) ha demostrado que la administración de anakinra mejora la disfunción endotelial en ratas diabéticas. Sin embargo, los niveles circulantes de IL-1 $\beta$  no se incrementan ni en modelos experimentales de diabetes (Yazar et al., 2011) ni en pacientes diabéticos (Mooradian et al., 1991; Pereira et al., 2014). Esto sugiere que la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  estaría focalizada en la pared vascular como parte de una respuesta inflamatoria paracrina (Peiró et al., 2017).

Además, en modelos animales con hipertensión, anakinra reduce la presión arterial y la fibrosis renal; sin embargo, apenas tiene efecto sobre la inflamación y la infiltración de leucocitos en el riñón (Ling et al., 2017). Anakinra también puede impedir la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por IL-1 $\beta$  presentes en aterosclerosis temprana (Shikama et al., 2015). La inhibición a corto plazo de IL-1 con anakinra, ha demostrado reducir el estrés oxidativo directamente al nivel de la pared vascular de pacientes con enfermedad renal crónica (Nowak et al., 2016).

### 1.8.5 Inhibidor de visfatina/Nampt: FK866

Existe un considerable interés para usar inhibidores de visfatin/Nampt, en especial para terapias contra el cáncer (Bi y Che, 2010). En 2002 se identificó el primer Inhibidor nanomolar de Nampt llamado FK866 (Hasmann y Schemainda, 2003). Hasta la fecha, solo dos compuestos, FK866 (APO866) y CHS828 (GMX1778) han llegado a ensayos clínicos (Holen et al., 2008; von Heideman et al., 2010).

Todos los inhibidores de Nampt reportados hasta la fecha comparten un modelo farmacóforo común: una piridina sustituida meta o para o un heterociclo que contiene piridina, una unidad de conexión con un aceptor de enlace de hidrógeno, un enlazador de cadena alquílica y una cola hidrofóbica capaz de interactuar con los aminoácidos hidrofóbicos del borde de la enzima. (Theeramunkong et al., 2015). Los inhibidores de Nampt ocupan el sitio activo

responsable de la unión de NAM y una cavidad en forma de túnel que se extiende desde este sitio activo (Watson et al., 2009), al unirse a la proteína Nampt, los heterociclos sobresalen del sitio de unión NAM imitando al sustrato natural (Theeramunkong et al., 2015).

FK866 es permeable a las células y no discrimina entre la actividad de iNampt y eNampt (Soncini et al., 2014). Inhibe específicamente su actividad enzimática, lo cual conduce a una disminución significativa de los niveles intracelulares de NAD<sup>+</sup> y NADH en el citosol, aunque no el NAD mitocondrial (Hasmann y Schemainda, 2003; Bruzzone et al., 2009), y a la muerte celular (Hasmann y Schemainda, 2003; Pittelli et al., 2010).

Los inhibidores de Nampt tienen efectos terapéuticos en animales con modelos de cáncer al inhibir la proliferación celular y promover la apoptosis (Sampath et al., 2015), aunque los ensayos clínicos en fase I (CHS828) o en fase II (FK866) en pacientes con cáncer presentan varios efectos adversos como anormalidades hematológicas y síntomas gastrointestinales, como anorexia y dolor abdominal (Hovstadius et al., 2002; Ravaud et al., 2005; von Heideman et al., 2010), así como erupción cutánea, cardiotoxicidad, y daño retiniano (Sampath et al., 2015). Los ensayos *in vitro* a nivel vascular, han descrito que FK866 inhibe la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt, tanto en microvasos mesentéricos de rata como en vasos humanos (Vallejo et al., 2011).

### 1.8.6 Inhibidor de la señalización de TLR: CLI-095

El compuesto CLI-095, inhibidor del receptor TLR4, es una pequeña molécula que se une al dominio TIR de TLR4 a través de Cys747, para inhibir su señalización (Takashima et al., 2009). Además, CLI-095 interfiere con la interacción de TIRAP y TLR4, lo que dificulta la activación de IRAK-1 y como consecuencia inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, así como citoquinas de expresión génica (Matsunaga et al., 2011; Carrillo-Sepulveda et al., 2015).

Mediante la administración de CLI-095, se ha determinado que TLR4 está involucrado en la disfunción endotelial y otros trastornos vasculares, en parte a través de la vía de señalización TLR4/NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2010; Wang y Miao, 2015). Además, CLI-095 inhibe la adhesión de leucocitos polimorfonucleares en células endoteliales activadas (Yang et al., 2010), suprime la formación de células espumosas e inhibe la vía de señalización TLR4/NF- $\kappa$ B lo que reduce efectivamente la aterosclerosis en ratones ApoE <sup>-/-</sup> (Wang y Miao, 2015)

Por otro lado, se ha descrito que CLI-095 también reduce la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de aniones superóxido en músculo liso vascular de ratones; además, reduce la migración y proliferación celular inducidas por la Ang II, lo que sugiere que TLR4 participa en la activación del sistema renina-angiotensina, lo cual contribuiría a la hipertensión y su disfunción endotelial (De Batista et al., 2014). En cultivos de VSMC expuestos a altos niveles de glucosa, CLI-095 atenúa significativamente la producción de ROS y la activación de NF- $\kappa$ B,

sugiriendo que la generación de ROS dependiente de NADPH oxidasa y la activación de NF- $\kappa$ B sería en parte mediada por la señalización de TLR4 (Carrillo-Sepulveda et al., 2015).

Asimismo, se ha descrito que CLI-095, reduce la disfunción eréctil en ratas diabéticas, mejorando la funcionalidad del músculo liso del pene, posiblemente por su interacción con el balance entre el estrés oxidativo y las vías NO/cGMP (Nunes et al., 2018). La activación de TLR4 también se ha visto implicada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, ya que contribuye a la hipertensión inducida por Ang II y se asocia con la disfunción endotelial, remodelación e inflamación vascular mediada por la vía de señalización MyD88 y JNK/NF- $\kappa$ B (Hernanz et al., 2015). En este sentido, se ha propuesto que TLR4 puede ser un interesante objetivo terapéutico para atenuar la disfunción vascular relacionada con distintos procesos inflamatorios vasculares (Carrillo-Sepulveda et al., 2015).

## **II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS

La adipoquina visfatina/Nampt se asocia a enfermedades cardiometabólicas, como diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. Además, esta adipoquina tiene un efecto deletéreo vascular en diversas especies, que incluye inflamación y disfunción endotelial. La hipótesis de trabajo es que, en ausencia de cualquier otra situación fisiopatológica, la infusión de visfatina/Nampt en ratones puede inducir directamente disfunción endotelial e inflamación vascular similares a las observadas en modelos de diabetes mellitus u obesidad.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de la adipoquina visfatina/Nampt para inducir *in vivo* disfunción vascular en los microvasos mesentéricos aislados de ratones C57BL/6 y analizar los posibles mecanismos celulares y moleculares involucrados. En definitiva, se ha pretendido valorar las perspectivas de que las vías fisiopatológicas activadas por visfatina/Nampt constituyan nuevas dianas terapéuticas para prevenir o atenuar el daño vascular asociado a las enfermedades cardiometabólicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar mediante reactividad vascular la respuesta que produce la administración *ex vivo* de visfatina/Nampt en microvasos mesentéricos aislados de ratones C57BL/6.
2. Analizar mediante reactividad vascular en microvasos mesentéricos aislados la respuesta que produce la administración *in vivo* durante siete días, mediante mini-bombas osmóticas, de visfatina/Nampt en ratones C57BL/6.
3. Estudiar en lisados de aortas procedentes de ratones infundidos con visfatina/Nampt por siete días, la capacidad de esta adipoquina para inducir mecanismos celulares pro-inflamatorios como NF- $\kappa$ B, la enzima iNOS y el inflammasoma NLRP3.
4. Estudiar en células endoteliales de vena umbilical humana la capacidad de visfatina/Nampt para inducir mecanismos celulares pro-inflamatorios, incluyendo NF- $\kappa$ B e inflammasoma NLRP3.
5. Analizar el papel que, en los efectos pro-inflamatorios de visfatina/Nampt, pueda tener la actividad enzimática Nampt y su producto, NMN, así como los receptores TLR4 y la activación del inflammasoma NLRP3.
6. Identificar los mecanismos celulares y moleculares por los que la visfatina/Nampt puede inducir disfunción endotelial, incluyendo, NF- $\kappa$ B e inflammasoma NLRP3, así como la actividad enzimática Nampt y su producto, NMN y los receptores TLR4.
7. Determinar el posible papel de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$ , producto final de la activación del inflammasoma, como efector final de la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt.

8. Estudiar la modulación farmacológica que los inhibidores o antagonistas de los citados mecanismos puedan tener sobre la disfunción endotelial evocada por visfatina/Nampt mediante el uso de agentes tales como FK866 (inhibidor de la actividad enzimática Nampt), CLI-095 (inhibidor del receptor TLR4), MCC950 (inhibidor del inflamasoma NLRP3) y anakinra (antagonista del receptor IL-1).

### **III MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 DECLARACIÓN DE ÉTICA

La investigación se ajusta a los principios establecidos en el Acuerdo de Transparencia en Experimentación Animal y las disposiciones legales españolas: Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) y la Asociación Europea para la Investigación Animal (EARA).

#### ***Células humanas***

La obtención de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) fue revisada y aprobada por el Comité de Ética del Hospital La Paz (HULP PI-1878 y extensión de 24 de Septiembre de 2015) y, en todos los casos, se hizo tras conseguir consentimiento informado por las madres donantes.

#### ***Animales***

Todos los animales utilizados en este trabajo experimental fueron manejados según el Reglamento del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (Acuerdo 2/ CG 14-07-16) y el Real Decreto 53/2013 que establece las normas básicas para la protección de los animales utilizados en experimentación. Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo acorde a las guías nacionales y europeas (Directiva 2010/63/EU) y aprobados por el CEI de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI-59-1052-A062), así como por los órganos correspondientes de la Comunidad de Madrid (PROEX 026/15).

### 3.2 CÉLULAS HUMANAS

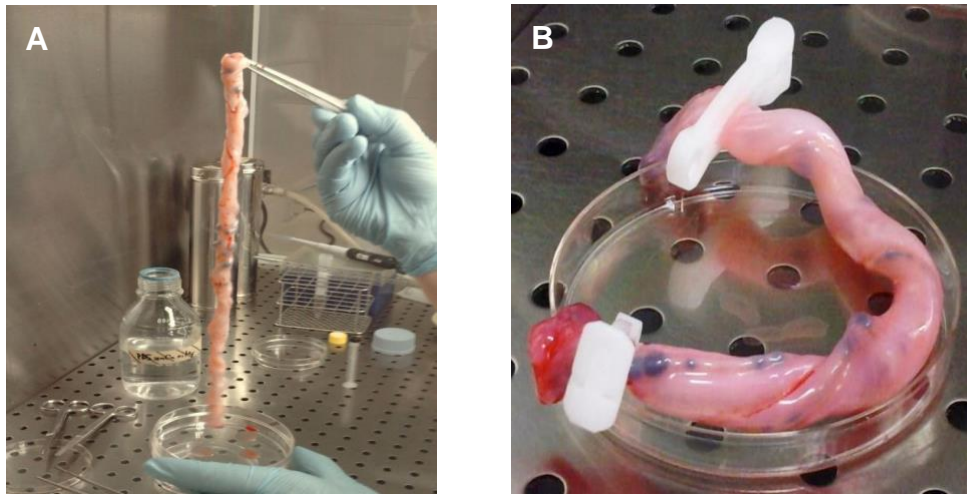
#### 3.2.1 Obtención de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

Para cada cultivo de células HUVEC se utilizaron dos o tres cordones umbilicales humanos procedentes del Hospital Universitario La Paz, y se procesaron de acuerdo a los procedimientos ya descritos (Peiró et al., 2007; Azcutia et al., 2010). Se excluyeron los cordones procedentes de madres donantes con diabetes, obesidad, hipertensión o cualquier otro tipo de enfermedad cardiovascular. Los cordones obtenidos en el hospital, se mantuvieron en un frasco estéril con medio DMEM-0,1% BSA, 0,005% de heparina sódica, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2,5 µg/mL de anfotericina B, hasta su recepción en el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, los cordones se introdujeron en frascos Falcon de 50 mL con PBS estéril para eliminar los restos de sangre. Con ayuda de una jeringa, se introdujo PBS en uno de los extremos de la vena del cordón umbilical para hacer lavados internos (Figura 9A). Este procedimiento se repitió hasta dejar de observar la salida de coágulos o sangre por el otro extremo de la vena umbilical. Luego, se colocó una pinza cauterizante estéril en uno de los extremos del cordón, obstruyendo la luz interna de la vena, y con la ayuda de una jeringa se introdujo por el otro extremo una solución estéril de colagenasa tipo II (2mg/mL) disuelta en PBS. Rápidamente, se pinchó el extremo libre del cordón y se dejó incubar con la solución descrita en



el interior de la vena durante 18 – 20 minutos a temperatura ambiente (Figura 9B). Esta solución fue empleada con el fin de favorecer el desprendimiento de las células endoteliales adheridas en la vena del cordón.



**Figura 9.** Extracción de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano. **A.** Parte del procedimiento de lavados con PBS de la vena umbilical humana. **B.** Incubación con colagenasa tipo II introducida en la luz del cordón umbilical.

Tras la incubación, se cortó uno de los extremos del cordón por encima de la pinza y en una placa se recogió la solución de colagenasa tipo II que contenía células endoteliales y hematíes. Luego, se procedió a cortar el otro extremo del cordón, para introducir PBS en el interior de la vena umbilical y recolectar los restos de células que pudieran quedar en su luz. Después de un par de lavados con PBS, el contenido recolectado en la placa se trasladó a un tubo estéril que contenía 20 mL de M199-10% FCS para neutralizar la acción de la colagenasa tipo II. El tubo se centrifugó durante 20 minutos a 1800 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió en M199-10% FCS y se centrifugó por 10 minutos más a 1000 r.p.m. Finalmente, el precipitado se re-suspendió nuevamente en el medio M199 con 20% de FCS, el cual contenía 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de suplemento de crecimiento de células endoteliales (Endothelial Cell Growth Supplement, EGCS), 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina y las concentraciones de antibióticos y L-glutamina descritas anteriormente. Las células se sembraron en un frasco de 75  $\text{cm}^2$  de superficie, el cual previamente se recubrió con una película de colágeno tipo I diluida en una solución estéril de ácido acético 0,1 M al 0,03% (p/v) y permaneció en la estufa húmeda a 37  $^{\circ}\text{C}$  y con 5% de  $\text{CO}_2$ .

El medio del cultivo se renovó cada 48 horas con M199-20% FCS. Al alcanzar la confluencia, se empleó la solución de tripsina al 0,05% para despegar las células por tripsinización y se sembraron en placas para los futuros experimentos. Una vez observada la confluencia en los cultivos, el medio M199-20% FCS fue sustituido por medio M199-10% FCS, con el fin de reducir la cantidad de suero del mismo. A continuación, las células fueron tratadas con visfatina/Nampt (25, 50 y 100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) o  $\text{IL-1}\beta$  (5  $\text{ng}/\text{mL}$ ) durante 18 horas; además, los

fármacos CLI-095 (1  $\mu\text{mol/L}$ ), FK866 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), MCC950 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) o anakinra se incubaron 20 minutos antes y durante la exposición con visfatina/Nampt. Para la realización de estos experimentos se utilizaron células entre los pases 1 a 4.

### 3.2.2 Caracterización celular

Después de obtener los cultivos, las HUVEC se caracterizaron utilizando un anticuerpo específico de la célula endotelial Von Willebrand, siguiendo la técnica de inmunofluorescencia indirecta previamente descrita (Romacho et al., 2009; Azcutia et al., 2010).

#### 3.2.2.1 Inmunofluorescencia indirecta

Las HUVEC se sembraron en cristales circulares estériles de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (2.0  $\text{cm}^2$ ) y se dejaron crecer en presencia de FCS. Una vez concluido el tiempo de tratamiento, se eliminaron los restos del medio celular lavando suavemente con PBS. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con PBS. Los sitios de unión inespecífica del anticuerpo fueron bloqueados con una solución de PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% de Triton X-100 (solución de bloqueo), durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Luego, se eliminó la solución de bloqueo sin efectuar lavados con PBS.

A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal para el factor VIII diluido en la solución de bloqueo (Tabla 1). Pasado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar los restos de anticuerpo no adherido. Las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario diluido también en la solución de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente, en agitación constante y oscuridad (Tabla 1). El anticuerpo secundario se encuentra acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488, que, al unirse a la fracción constante del anticuerpo primario, emite fluorescencia a una longitud de onda de 570 nm. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y un último lavado con agua para eliminar las sales del PBS.

Para el control negativo de la técnica, se reservó un pocillo de la placa en condiciones basales, en el que se renovó la solución de bloqueo en lugar de añadir el anticuerpo primario. Esto nos permitió determinar que la fluorescencia observada correspondía a la tinción específica provocada por el anticuerpo primario y no al fondo inespecífico derivado del fluorocromo acoplado al anticuerpo secundario.

Para visualizar los núcleos celulares, las preparaciones se incubaron con una solución de PBS que incluía 0,5  $\mu\text{M}$  de 4,6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl (DAPI), un colorante que tiene afinidad por el ADN y emite fluorescencia a una longitud de onda de 570 nm. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos empleando el reactivo ProLong, un medio

montaje acuoso rico en glicerol. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Eclipse TE300 (Nikon) y las imágenes se captaron con una cámara digital Nikon acoplada al microscopio, empleando un objetivo de 40x, 100x y un ocular de 10x. Para cada tratamiento, las imágenes se captaron en las mismas condiciones de ganancia y tiempo de exposición.

**Tabla 1.** Características del anticuerpo primario y secundario utilizados para la inmunofluorescencia indirecta y sus condiciones de uso, en lisados de cultivos celulares de HUVEC.

T.A. temperatura ambiente

Tipo de Anticuerpo	Anticuerpos	Dilución	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
Primario	Factor VIII	1:100	conejo	2 horas	4	Dako (Glostrup, Dinamarca)
Secundario	Anti Ig-G de mouse. Alexa Fluor 488	1:250	mouse	1 hora	T.A.	Sigma Aldrich Chemical Co.

### 3.2.3 Western blot

La técnica de Western blot sirve para determinar los niveles de proteínas activadas. Por ello, esta técnica se utilizó para determinar los niveles de proteína NF- $\kappa$ B fosforilada (p-p65), NF- $\kappa$ B p65 total (p-65), NLRP3, IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina.

#### 3.2.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas.

Las células se lavaron con PBS frío dos veces, luego se lisaron mecánicamente con rascadores en un tampón de lisis. Los lisados celulares obtenidos se dejaron reposar en hielo por 15 minutos y se centrifugaron a 13.000 r.p.m por un minuto a 4°C. Los precipitados obtenidos se descartaron y se midió la concentración de proteína presente en los sobrenadantes mediante el ensayo colorimétrico del ácido bicinónico (BCA). Este método se basa en la reducción de Cu<sub>2</sub><sup>+</sup> a Cu<sup>+</sup> en medio alcalino (reacción de Biuret), que es proporcional a la cantidad de proteína en la muestra. Luego el BCA forma una escala de colores púrpuras con los iones Cu<sup>+</sup> en medio alcalino, cuya absorbancia se determina a 540 nm de longitud de onda en un lector de placas (ELX800). Los extractos proteicos se alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

#### 3.2.3.2 Electroforesis y transferencia de proteínas.

Los extractos de proteínas (15-20  $\mu$ g) se diluyeron en proporción 3:1 en un tampón de Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos a 100 °C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de porcentaje variable (8-12%) según la proteína de interés, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) a una corriente entre 90 - 130 V durante 1 - 2 horas. Después de separar las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro 0,45  $\mu$ m, durante 3 horas a 350 mA constantes.

### 3.2.3.3 Incubación de anticuerpos

*Bloqueo de membranas.* Seguidamente, se bloquearon los sitios de unión inespecífica a los anticuerpos con una solución de tampón salino de Tris y Tween 20 (TBS-T) durante toda la noche. Las membranas una vez bloqueadas se incubaron con los anticuerpos correspondientes.

*Incubación de anticuerpos primarios.* Se determinaron los niveles de la expresión de proteínas de NF- $\kappa$ B fosforilado (p-p65), NF- $\kappa$ B total (p65), NLRP3, IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina, empleando los respectivos anticuerpos primarios incubados en leche 5%, BSA 5% o TBS-T según las condiciones descritas en la tabla 2. Al día siguiente, se realizaron tres lavados sucesivos de 10 min cada uno, con TBS-T.

*Incubación de anticuerpos secundarios.* Luego de los lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3), los cuales están unidos a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que dará la luminiscencia. Finalmente, se efectuaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T para proceder con el revelado.

**Tabla 2.** Características de los anticuerpos primarios utilizados y sus condiciones de uso, utilizados en lisados de cultivos celulares de HUVEC.  
T.A. temperatura ambiente

Bloqueo	Tiempo de bloqueo	Anticuerpos primarios (Ac 1 <sup>o</sup> )	Dilución	Especie	Tiempo de incubación del Ac. 1 <sup>o</sup>	T (°C)	Casa comercial
Leche 5%	18 horas	IL-1 $\beta$	1:1000	cabra	2 hora	T.A.	R&D systems
Leche 5%	18 horas	pro-IL-1 $\beta$	1:1000	cabra	2 hora	T.A.	R&D systems
BSA 5%	1 hora	NF- $\kappa$ B p-p65	1:1000	conejo	18 horas	4	Cell signaling technology
Leche 5%	1 hora	NF- $\kappa$ B p65	1:1000	conejo	18 horas	4	Cell signaling technology
TBS-T	1 hora	NLRP3	1:500	ratón	18 horas	4	AdipoGen Life Sciences
Leche 2.5%	1 hora	$\beta$ -actina	1:50 000	conejo	1 hora	T.A.	Sigma-Aldrich.

**Tabla 3.** Características de los anticuerpos secundarios utilizados, bloqueos y condiciones de uso. T.A. temperatura ambiente

Anticuerpos secundarios (HRP)	Dilución	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
Anti-conejo	1:10 000	asno	1 hora	T.A.	Bethyl laboratories. Inc
Anti-ratón	1:10 000	asno	1 hora	T.A.	Bethyl laboratories. Inc

#### 3.2.3.4 Revelado de membrana

Se utilizó el kit comercial de quimioluminiscencia por luminol (ECL Select), produciéndose la emisión de luz por oxidación de la peroxidasa. Las bandas inmuno-reactivas se detectaron al incubar las membranas en una mezcla de reactivos de este kit durante uno a dos minutos a temperatura ambiente y evitando el contacto con la luz. Luego las membranas se cubrieron con un plástico tipo film y se expusieron al analizador de imagen (Chemidoc™ XRS) durante el tiempo necesario para obtener la señal del anticuerpo buscado. Asimismo, la expresión de  $\beta$ -actina se empleó como control de carga, y siguió el mismo procedimiento para revelar la membrana. La cuantificación de la densitometría de las bandas se realizó empleando el programa informático de libre acceso NIH Image J 1.44p (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

La activación de NF- $\kappa$ B p-p65 se expresó como la proporción entre la forma fosforilada NF- $\kappa$ B p-p65, la forma total NF- $\kappa$ B p65 y la cantidad de  $\alpha$ -tubulina. Para ello, primero se incubó la membrana con un anticuerpo primario frente a NF- $\kappa$ B p-p65 y el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa de rábano (HRP) siguiendo las condiciones que aparecen en la tabla 2 y 3. Posteriormente, la membrana se reprobó para medir la NF- $\kappa$ B p65 y luego se incubó con su respectivo anticuerpo secundario.

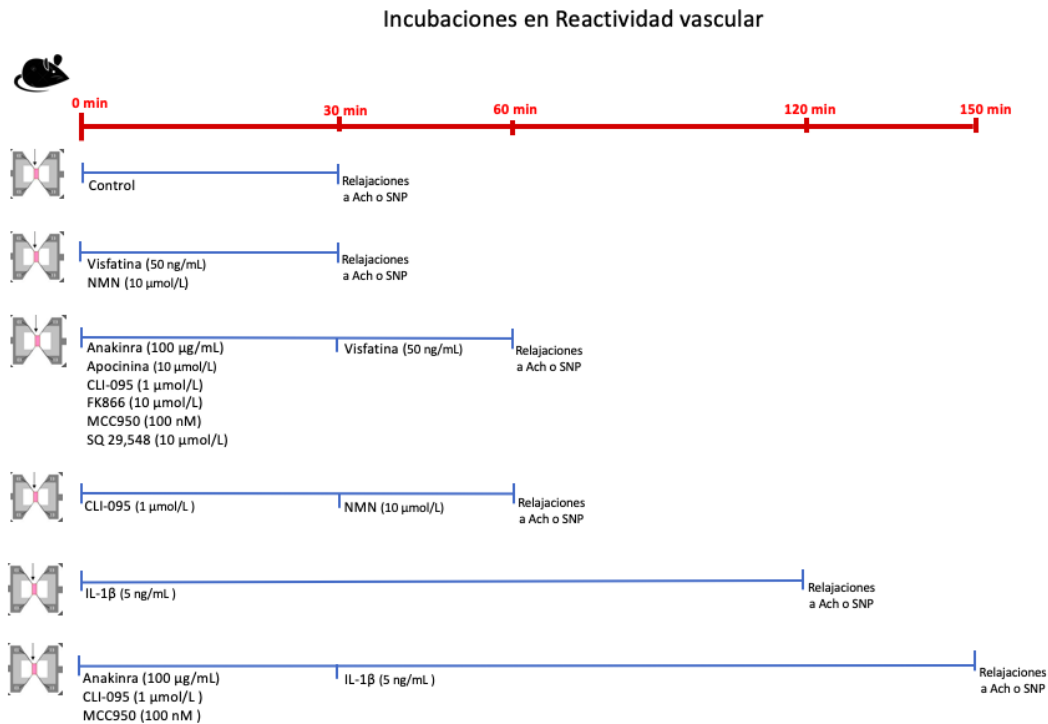
Por otro lado, la activación de NLRP3, IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$ , se expresaron como la proporción entre NLRP3, IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$  y la cantidad de  $\alpha$ -tubulina. Seguidamente, las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con una solución de TBS-T y se incubaron con un anticuerpo.

### 3.3 ANIMALES

Ratones machos C57BL/6 (Charles River laboratories) de 4 meses de edad y de peso vivo en torno a 30 gramos, fueron obtenidos y criados en la Universidad Autónoma de Madrid, España. Los animales fueron criados bajo las mismas condiciones ambientales y fisiológicas en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, con una temperatura ambiente de 23 °C a y alimentados con dieta normal *ad libitum* durante todo el ensayo experimental. Antes de completar los experimentos, los animales fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub>.

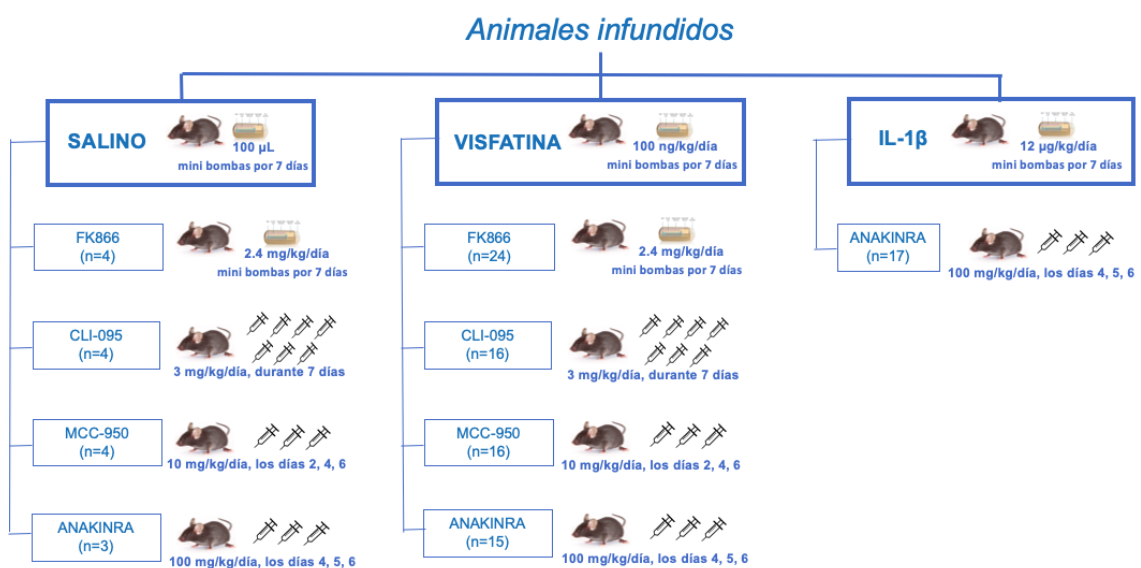
#### 3.3.1 Grupos de animales

Un grupo de animales no recibió ningún tipo de tratamiento (controles) y, tras el sacrificio, se procedió con la toma de muestra de órganos (aorta, mesenterio) y la extracción de los vasos mesentéricos. Estos últimos fueron utilizados para analizar las acciones de los distintos fármacos ensayados mediante su estudio *in vitro*, utilizando el miógrafo de pequeños vasos para evaluar la reactividad vascular. Los experimentos se diseñaron según el esquema de la Figura 11.



**Figura 11.** Diagrama de los fármacos incubados en las arterias mesentéricas procedentes de ratones controles para los estudios de reactividad vascular.

El resto de los animales fueron separados en diferentes grupos, según el tratamiento recibido por infusión continua mediante mini-bombas osmóticas o a través de inyecciones intraperitoneales (Figura 12; Tabla 4). Tras ser sacrificados, también se procedió con la toma de muestras de órganos (aorta, mesenterio) y las arterias mesentéricas fueron utilizadas en reactividad vascular.



**Figura 12.** Diagrama de los grupos de tratamientos para los estudios de reactividad vascular a través de bombas osmóticas o dosis inyectables vía peritoneal; entre paréntesis se indica el número de animales utilizados para cada estudio.

**Tabla 4.** Dosis administradas de fármacos a través de bombas mini-osmóticas o inyectables intraperitoneales.

Grupo	Vía de administración	Dosis	Características del tratamiento	Día de sacrificio
Suero salino	Mini-bomba osmótica	12 $\mu$ L/día	Infusión continua durante 7 días	7
Visfatina/Nampt	Mini-bomba osmótica	100 ng/kg/día	Infusión continua durante 7 días	7
FK866	Mini-bomba osmótica	2,4 mg/kg/día	Infusión continua durante 7 días	7
CLI-095	Intraperitoneal	3 mg/kg/día	Inyección cada día durante 7 días	7
MCC950	Intraperitoneal	10 mg/kg	Inyección los días 2, 4 y 6	7
Anakinra	Intraperitoneal	100 mg/kg	Inyección los días 4, 5 y 6	7
Visfatina/Nampt + FK866	Mini-bomba osmótica en ambos casos	100 ng/kg/día + 2,4 mg/kg/día	Infusión continua durante 7 días en ambos casos	7
Visfatina/Nampt + CLI-095	Mini-bomba osmótica + Intraperitoneal	100 ng/kg/día + 3 mg/kg/día	Infusión continua durante 7 días + Inyección cada día durante 7 días	7
Visfatina/Nampt + MCC950	Mini-bomba osmótica + Intraperitoneal	100 ng/kg/día + 10 mg/kg	Infusión continua durante 7 días + Inyección los días 2, 4 y 6	7
Visfatina/Nampt + Anakinra	Mini-bomba osmótica + Intraperitoneal	100 ng/kg/día + 100 mg/kg	Infusión continua durante 7 días + Inyección los días 4, 5 y 6	7
IL-1 $\beta$	Mini-bomba osmótica	12 $\mu$ g/kg/día	Infusión continua durante 7 días	7
IL-1 $\beta$ + Anakinra	Mini-bomba osmótica + Intraperitoneal	12 $\mu$ g/kg/día + 100 mg/kg	Infusión continua durante 7 días + Inyección los días 4, 5 y 6	7

### 3.3.2 Registros de peso, glucemia y presión arterial por pletismografía de la cola

Todos los animales, tanto controles como tratados, fueron evaluados para registrar su peso en vivo, niveles de glucosa en sangre y presión arterial. En caso de los animales controles, dichos parámetros fueron registrados en el día 0; mientras que en los animales tratados las medidas se realizaron en dos oportunidades, en el día 0 y antes del sacrificio (Tabla 5).

Se obtuvo un peso promedio de  $29.1 \pm 1.9$  g para ratones machos C57BL/6 de 14 semanas. Para la glucemia se utilizó el glucómetro (Contour XT) y tiras reactivas (Contour Next) y se consideraron los rangos fisiológicos entre  $109.5 \pm 3.2 - 158.3 \pm 2.5$  mg/dL, equivalente a  $6.08 \pm 0.18 - 8.79 \pm 0.14$  mmol/L respectivamente (Han et al., 2008). La presión sanguínea fue medida a través del pletismógrafo de cola para ratones, con una media  $\pm$ ES de  $94.3 \pm 1.6$  mmHg como la media de la presión sanguínea arterial (Greig et al., 2015).

**Tabla 5.** Parámetros: peso vivo, glucosa y presión arterial de los animales controles y tratados.

Tratamiento	Peso en vivo (g)		Glucosa plasmática (mmol/L)		Presión arterial (mm Hg)	
	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6	Día 0	Día 6
Suero salino (100 mL/día)	28,97 ± 0,49	27,70 ± 1,82	8,22 ± 0,45	6,81 ± 0,4	102,67 ± 5,32	104,52 ± 2,24
Visfatina/Nampt (100 ng/kg/día)	29,31 ± 0,65	28,97 ± 0,49	7,94 ± 1,17	7,72 ± 0,53	98,80 ± 2,12	101,13 ± 2,19
FK866 (2.4 mg/kg/día)	28,45 ± 1,41	29,90 ± 1,21	7,62 ± 0,45	8,2 ± 0,54	102,53 ± 3,10	93,52 ± 5,31
CLI-095 (3 mg/kg/día)	28,70 ± 0,67	26,10 ± 0,72*	5,98 ± 0,16	6,09 ± 0,12	97,84 ± 3,71	102,72 ± 2,18
MCC950 (10 mg/kg/día)	24,75 ± 0,84	24,38 ± 0,86	6,63 ± 0,51	6,99 ± 0,6	100,96 ± 1,58	100,96 ± 1,58
Anakinra (100 mg/kg/día)	29,56 ± 0,66	30,65 ± 0,91	7,76 ± 0,98	6,64 ± 0,17	99,49 ± 2,97	101,08 ± 5,86
Visfatina/Nampt +FK866	29,40 ± 0,77	30,02 ± 0,62	7,72 ± 0,59	7,22 ± 0,59	100,64 ± 11,57	93,45 ± 3,62
Visfatina/Nampt + CLI-095	29,68 ± 0,23	27,90 ± 0,65 <sup>+</sup>	7,35 ± 1,46	7,6 ± 1,09	105,30 ± 5,86	103,09 ± 3,61
Visfatina/Nampt + MCC950	27,03 ± 0,65	26,68 ± 0,50	6,48 ± 0,47	7,2 ± 0,49	111,20 ± 5,57	103,22 ± 2,70
Visfatina/Nampt + Anakinra	31,00 ± 0,40	30,80 ± 0,20	7,55 ± 0,27	8,74 ± 0,86	114,90 ± 0,93	101,35 ± 5,41
IL-1 $\beta$ (12 $\mu$ g/kg/día)	29,40 ± 0,72	27,70 ± 8,00	6,66 ± 0,28	4,56 ± 0,42 <sup>#</sup>	97,52 ± 2,73	102,18 ± 2,42
IL-1 $\beta$ + Anakinra	30,67 ± 7,67	31,48 ± 0,56	7,06 ± 0,71	6,76 ± 0,8	108,25 ± 6,23	95,51 ± 6,23

\*p<0.05 frente a CLI-095 en el día 0.

<sup>+</sup>p<0.05 frente Visfatina/Nampt + CLI-095 en el día 0.

<sup>#</sup>p<0.05 frente a suero salino en el día 6.

### 3.3.3 Implantación de mini-bombas osmóticas

Los fármacos visfatina/Nampt, IL-1 $\beta$ , FK866 (inhibidor específico de Nampt) y la solución salina (NaCl 0.9%), fueron administrados en los animales a través de mini-bombas osmóticas (Alzet) con capacidad de 100  $\mu$ L e infusión constante de 0,5  $\mu$ L/hora, cargadas con el fármaco de elección según cada tratamiento (Tabla 4), y siguiendo las indicaciones del fabricante (Alzet, [http://www.alzet.com/products/guide\\_to\\_use/formulating.html](http://www.alzet.com/products/guide_to_use/formulating.html)). El procedimiento utilizado para la implantación de las minibombas supuso en primer lugar, tras un ayuno previo de 12 horas, la anestesia de los animales con 50  $\mu$ L de ketamina (Imalgene) y 10  $\mu$ L de xilacina (Xilagesic 2%), ambos fármacos disueltos en 0,5 mL NaCl al 0,9% y administrados por vía intraperitoneal. A continuación, en condiciones de asepsia quirúrgica y utilizando material de microcirugía, se implantaron una o dos mini-bombas osmóticas a nivel subcutáneo en el dorso del animal (ligeramente posterior a la escápula). Se realizaron puntos simples de sutura (Alzet, [http://www.alzet.com/products/guide\\_to\\_use/implantation\\_and explantation.html](http://www.alzet.com/products/guide_to_use/implantation_and explantation.html)). En algunos



casos, los animales recibieron un tratamiento adicional por vía intraperitoneal, según la Tabla 4. Finalmente, tras siete días desde la implantación de la mini-bomba e infusión del fármaco respectivo, los animales fueron sacrificados de la forma anteriormente descrita.

### 3.3.4 Administración por vía intraperitoneal

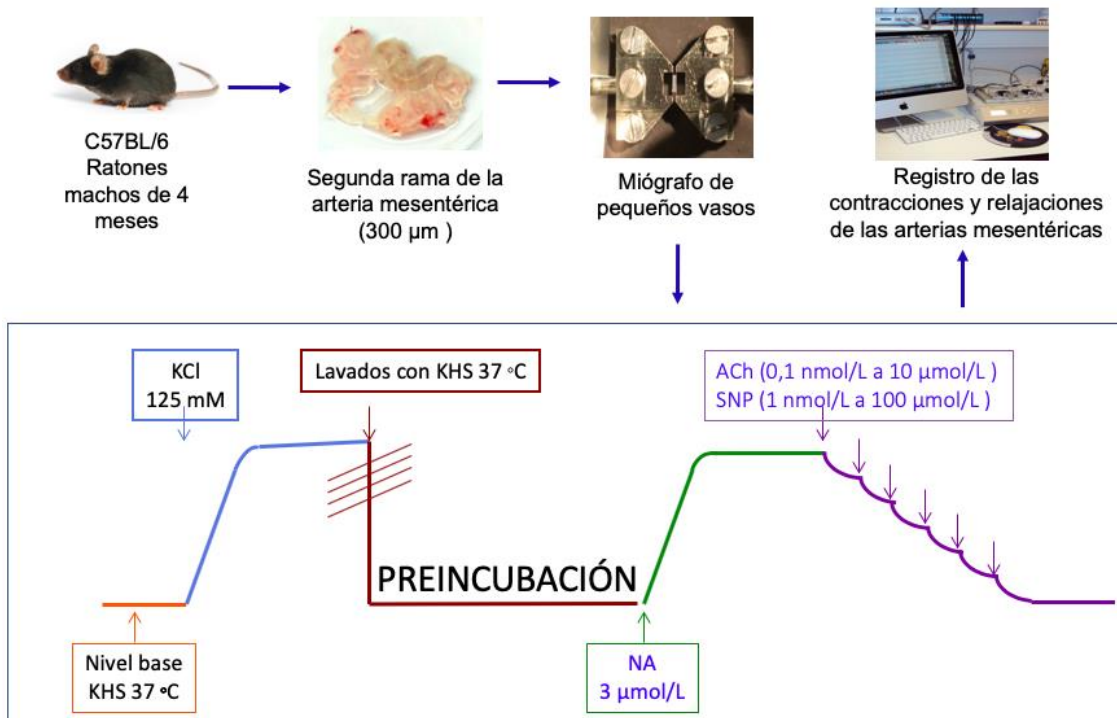
Los fármacos anakinra (antagonista del receptor de IL-1), CLI-095 (Inhibidor de la señalización del TLR) y MCC950 (inhibidor del inflamasoma NLRP3) fueron administrados por vía intraperitoneal. Las dosis y días de administración están descritos en la Tabla 4.

### 3.3.5 Toma de muestras

Una vez sacrificado el animal por asfixia con CO<sub>2</sub>, se realizó un corte transversal por la línea media ventral para exponer la cavidad torácica y abdominal y se realizó la toma de muestras, de la forma siguiente: (A) Mesenterio: Se extrajo la totalidad del mesenterio, desde el inicio del duodeno hasta el final del íleon. Se colectó en un envase con solución de Krebs-Henseleit (KHS) a 4 °C y se trasladó en hielo hasta llegar al laboratorio y proceder al estudio de reactividad vascular como se indica más adelante; (B) Aorta: La aorta fue aislada desde el cayado aórtico, pasando por la aorta torácica, hasta el final de la arteria mesentérica caudal. Se realizaron dos cortes para obtener tres segmentos. El primer segmento se colectó en formalina 4% por 2 horas y luego se almacenó en alcohol 70% hasta proceder al parafinado y cortes histológicos. Los otros dos tercios fueron sumergidos en N<sub>2</sub> y se almacenaron a -80 °C para proceder con el western blot.

### 3.3.6 Reactividad vascular

Una vez obtenido el mesenterio, como se indica en el apartado anterior, se aislaron las ramas segundas de la arteria mesentérica, las cuales fueron divididas en segmentos de 2 mm con diámetro interno medio de 300 µm aproximadamente, libres de grasa y tejido conectivo, para ser montadas en el miógrafo de pequeños vasos, según la técnica descrita por Mulvany y Halpern (1977) y utilizando el software Myonorm 4 (Cibertec S.A.). Cada segmento arterial se colocó en una de las cámaras del miógrafo, la cual contenía KHS (5 mL) gaseado con carbógeno (CO<sub>2</sub> al 5% y O<sub>2</sub> al 95%) a 37 °C. La tensión isométrica de cada segmento arterial fue registrada con el programa Myonorm 4. Para determinar la viabilidad de las arterias, los segmentos se pre-contrajeron con Krebs con potasio (125 mmol/L) seguido de cuatro lavados con KHS a 4 °C, hasta alcanzar el nivel inicial de reposo. Finalmente, los segmentos se contrajeron con noradrenalina (NA; 3 µM) y se analizó la vasodilatación dependiente del endotelio mediante la administración de concentraciones crecientes y acumulativas de acetilcolina (ACh; 0,1 nmol/L a 10 µmol/L). En algunos segmentos se estudió la vasodilatación independiente del endotelio mediante la administración de nitroprusiato sódico (SNP; 1 nmol/L a 100 µmol/L) (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema del protocolo utilizado en la reactividad vascular de vasos pequeños.

### 3.3.6.1 Segmentos arteriales procedentes de animales controles

En estos segmentos se analizó el efecto *ex vivo* de los fármacos descritos sobre las relajaciones dependientes o independientes de endotelio. Para ello, los vasos se incubaron con 50 ng/mL visfatina/Nampt o 10 µmol/L nicotinamida (NMN) durante 20 minutos en las cámaras del miógrafo; mientras, que los vasos incubados con 5 ng/mL IL-1β se incubaron durante 120 minutos.

Por otro lado, se analizó también la acción de distintos fármacos capaces de bloquear diferentes mecanismos celulares sobre los efectos de visfatina/Nampt, NMN o IL-1β; tales como FK866 (10 µmol/L), CLI-095 (1 µmol/L), MCC950 (100 nmol/L), apocinina (inhibidor de la actividad NADPH oxidasa; 10 µmol/L), SQ-29,548 (antagonista de los receptores del tromboxano A<sub>2</sub>; 10 µmol/L) y anakinra (antagonista de los receptores para IL-1; 100 µg/mL). Estos agentes se añadieron *ex vivo* en las cámaras del miógrafo 20-30 min antes de la adición de los estímulos visfatina/Nampt, NMN, IL-1β o de la curva a ACh o SNP. Tras los periodos de incubación de los inhibidores y antagonistas en presencia o ausencia de los estímulos, se procedió con la administración de NA y ACh o SNP (Fig. 10).

3.3.6.2 *Segmentos arteriales procedentes de animales infundidos (mediante mini-bombas o administración intraperitoneal)*

Luego de aislar los microvasos mesentéricos de los animales infundidos con salino, visfatina/Nampt o IL-1 $\beta$ , se siguió el protocolo para estudiar la reactividad vascular y registrar las contracciones con NA y las relajaciones dependientes e independientes de endotelio con ACh o SNP respectivamente. El mismo proceso se realizó con los animales que recibieron la administración intraperitoneal de los fármacos antagonistas e inhibidores como FK866, CLI-095, MCC950 o anakinra, en ausencia o no de los estímulos visfatina/Nampt o IL-1 $\beta$ . Los grupos de tratamientos y las dosis utilizadas de cada fármaco están descritas en la Tabla 4 y Fig. 11. Por último, algunos microvasos mesentéricos procedentes de ratones infundidos con visfatina/Nampt, fueron incubados entre 20 y 30 minutos *ex vivo* con apocinina (10  $\mu$ mol/L), SQ 29,548 (10  $\mu$ mol/L) o anakinra (100  $\mu$ g/mL) y se procedió con los análisis de las curvas de NA, ACh o SNP.

3.3.7 Western blot

3.3.7.1 *Extracción de proteínas de aortas*

Las aortas, congeladas a -80 °C, fueron pulverizadas manualmente sobre hielo seco evitando la descongelación del tejido durante el proceso. Con la ayuda de una espátula se colectó cada muestra pulverizada en un vial con 50  $\mu$ L de tampón de lisis. Se realizaron 8 ciclos de vórtex por 15 segundos y reposo en hielo durante 20 minutos. Adicionalmente, se homogeneizaron mecánicamente las muestras con 2 ciclos más de vórtex por 15 segundos y reposo en hielo durante 20 minutos. Los viales se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante en viales rotulados y duplicados por muestra. Finalmente, los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta proceder con el Western blot.

3.3.7.2 *Cuantificación de proteínas por el método de BCA.*

A través del método colorimétrico "BCA protein assay" se determinó la cantidad de proteína para cada muestra de aorta. Se utilizó una placa de 96 pocillos (0,32 cm<sup>2</sup>) para preparar la curva patrón (estándar); en cada pocillo se agregó 5  $\mu$ L de conocidas concentraciones crecientes de suero de albúmina bovino (BSA; 0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2) más 5  $\mu$ L de tampón de lisis. Por cada muestra a analizar, se agregó en cada pocillo 2.5  $\mu$ L de extracto proteico (muestra) y 7.5  $\mu$ L de agua milliQ, obteniendo un total de 10  $\mu$ L por pocillo por cada concentración de la curva patrón y muestra. A continuación, se añadió a cada pocillo (curva patrón y muestras) 200  $\mu$ L del reactivo comercial compuesto por dos soluciones mezcladas previamente. La placa se dejó en la estufa a 37 °C y protegida de la luz durante 30 min. Luego se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 540 nm en un lector de placas (ELX800).

### 3.3.7.3 Electroforesis y transferencia de proteínas.

Los extractos proteicos de aorta (20 µg) se disolvieron en tampón de Laemmli en una proporción 3:1, respectivamente. Inmediatamente, las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 100° C y se conservaron en hielo. En cada pocillo del gel, se cargó 20 µg de proteína de aorta. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida del 10 – 12 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) a una corriente entre 90 - 130 V durante 2-3 horas. Después de separar las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro 0,45 µm, durante 3 horas a 350 mA constantes.

### 3.3.7.4 Incubación de anticuerpos

*Bloqueo.* Finalizada la transferencia, las uniones inespecíficas de los anticuerpos presentes en la membrana de nitrocelulosa fueron bloqueados empleando leche en polvo desnatada al 2,5% o 5%, o BSA 5%, diluidos en la solución de tampón TBS-T durante 30 - 60 minutos a temperatura ambiente (T.A.)

*Incubación de anticuerpos primarios.* Se determinaron los niveles de la expresión de proteínas de NF-κB fosforilado (p-p65), NF-κB total (p65), iNOS, NLRP3 y β-actina, empleando los respectivos anticuerpos primarios incubados en leche 5%, BSA 5% o TBS-T según las condiciones descritas en la tabla 6. Al día siguiente, se realizaron tres lavados sucesivos de 10 min cada uno, con TBS-T.

*Incubación de anticuerpos secundarios.* Luego de los lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 7), los cuales están unidos a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que dará la luminiscencia. Finalmente, se efectuaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T para proceder con el revelado.

**Tabla 6.** Características de los anticuerpos primarios utilizados y sus condiciones de uso. T.A. temperatura ambiente

Bloqueo	Tiempo	Anticuerpos primarios	Dilución	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
BSA 5%	1 hora	NF-κB p-p65	1:1000	conejo	18 horas	4	Cell signaling technology
Leche 5%	1 hora	NF-κB p65	1:1000	conejo	18 horas	4	Cell signaling technology
TBS-T	30 min	iNOS	1:1000	conejo	18 horas	4	Abcam
BSA 5%	1 hora	COX-2	1:500	conejo	18 horas	4	Cell signaling technology
TBS-T	1 hora	NLRP3	1:500	ratón	18 horas	4	AdipoGen Life Sciences
Leche 2.5%	1 hora	β -actina	1:50 000	conejo	1 hora	T.A.	Sigma-Aldrich.

**Tabla 7.** Características de los anticuerpos secundarios utilizados y sus condiciones de uso.  
T.A. temperatura ambiente

Anticuerpos secundarios (HRP)	Dilución	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
Anti-conejo	1:10 000	asno	1 hora	T.A.	Bethyl laboratories. Inc
Anti-ratón	1:10 000	asno	1 hora	T.A.	Bethyl laboratories. Inc

### 3.3.7.5 Revelado de la membrana.

Se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 3.2.3.4.

## 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES) de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prisma 5<sup>®</sup> utilizando la *t*-Student pareada y no pareada o el ANOVA de una o dos vías seguido de la prueba *post hoc* Bonferroni. Se consideró el nivel de significancia a  $p < 0.05$ .

## 3.5 MATERIALES

### 3.5.1 Equipos de laboratorio

- Agitador basculante. Marca Labnet, modelo Rocker 25.
- Agitador vortex. Marca Heidolph Reax, modelo 2000
- Analizador de imagen Chemidoc™ XRS System. Marca Bio-Rad.
- Balanza digital. Marca Sartorius, modelo BP61S
- Baño de metacrilato
- Cámara digital. Marca Nikon, modelo sight DS-U3.
- Centrifuga de tubos de ensayo. Marca Alresa Diotor.
- Congelador (Thermo scientific Revco)
- Equipo de electroforesis (western blot) y fuente de alimentación. Marca Bio-Rad Power Pac basic 300 v, 400 mA, 75 w.
- Estufa a 37 °C. Marca Napco, modelo 5415.
- Glucómetro Contour XT y tiras reactivas para glucosa en sangre Contour Next. Marca Ascencia Diabetes Care Holdings AG).
- Impresora
- Lector de placas. Marca BIO-TEK Instruments, modelo ELX800
- Luminómetro (Optocomp IB Bacterial Systems, GEM Biomedical Inc, Hamdem, CT, Estados Unidos)
- Lupa binocular. Marca Wild Heerburg, Plan 1X.
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf centrifuge, modelo 4515R.
- Microscopio de epifluorescencia. Marca Nikon, modelo Eclipse TE300.
- Micrótopo (marca)

- Miógrafo para pequeños vasos. Marca Danish Myotechnology (DMT), modelo 610M; transductor Modelo PRE 206-4, Cibertec S.A.; Analizador de datos Marca Biopac systems, Inc, modelo MP100; Programa Myonorm 4, marca Cibertec S.A.
- Ordenadores (Apple)
- Pletismógrafo de cola. Niprem 645 y programa Niprem 1.5. Cibertec S.A.
- Termobloque circular (Bunsen)

### 3.5.2 Programas para ordenadores

- Excel. Registro de datos
- Graph Prisma 5. Paquete estadístico.
- Image J, cuantificación de los niveles de proteínas de western blot.
- Myonorm 4. Registra las fuerzas (mN) de contracción y relajación de los microvasos arteriales.
- NIS- Elements, Imaging software. Version 4.50. Laboratory Imaging. Analisis de imagenes con fluorescencia indirecta.

### 3.5.3 Materiales

- Frascos de siembra de células y frascos Falcon (TPP, Trasadingen).
- Membranas de nitrocelulosa 0.45  $\mu\text{m}$  (Cat # 162-0115, Bio-Rad Laboratories).
- Mini-bombas osmóticas ALZET (modelo 1007D, DURECT Corporation, Cupertino).
- Portaobjetos (Menzel Gläser, Braunschweig, Alemania).
- Tubos estériles de EDTA (BD, Franklin Lakes)

### 3.5.4 Reactivos

#### *Anticuerpos primarios*

- Anti-iNOS antibody (Cat # ab202417, EP16634, Abcam).
- Anti-mIL-1 $\beta$  antibody goat IgG (Cat # AF-401-NA, R&D system)
- Anti-NLRP3/NALP3, mAb antibody (Cryo-2) (Cat # AG-20B-0014-C100, AdipoGen Life Sciences)
- Anticuerpo contra el Factor VIII (Dako, Glostrup).
- COX-2 (Cat # 4842, Cell signaling technology)
- Monoclonal anti- $\beta$ -actin-peroxidase. Clone AC-15, inmunoglobulina purificada (Cat. # A3854, Sigma-Aldrich).
- NF- $\kappa$ B p65 rabbit antibody (Cat # 8242, Cell signaling technology)
- Phospho-NF- $\kappa$ B p65 monoclonal rabbit anti-body (Cat # 3033, Cell signaling technology)

*Anticuerpos secundarios*

- Anti Ig-G de mouse. Alexa Fluor 488 (Sigma Aldrich Chemical Co.)
- Anti- Goat IgG-h+i, conjugate HRP (Bethyl laboratories. INC.).
- Mouse IgG-heavy and light chain antibody, conjugate HRP (Cat # A90-137P, Bethyl laboratories. INC.).
- Rabbit IgG-heavy and light chain antibody, conjugate HRP (Cat # A120-108P, Bethyl laboratories. INC.).

*Fármacos utilizados*

- Acetilcolina (ACh) (Cat # A901 150 mg, Sigma Aldrich)
- Anakinra (Kineret ©). (100 mg/0,67 ml, solución inyectable en jeringa precargada.
- Apocinina (Cat # A10809-25G, Sigma Aldrich)
- CLI-095 (Cat # tlr-cli95 1 mg, Invitrogen)
- FK866 (Cat # F8557-5MG, Sigma Aldrich)
- Nitroprusiato sódico (SNP) (Cat # 71778 25 g, Sigma Aldrich)
- NMN (Cat # N3501-25MG, Sigma Aldrich)
- Noradrenalina (NA) (Cat # N5785-1g, Sigma Aldrich)
- Recombinant Human IL-1 $\beta$  (Cat # 200-01B 5 ug, Peprotech Inc.) con un nivel de endotoxina inferior a 0,1 ng/ $\mu$ g de proteína (<1 EU/ $\mu$ g).
- Recombinant Human PBEF/NAMPT/visfatin (Cat # 130-09 5 ug, Peprotech Inc.) con un nivel de endotoxina inferior a 0,1 ng/ $\mu$ g de proteína (<1 EU/ $\mu$ g).
- SQ 29,548 (CAS 98672-91-4 1 mg, Cayman Chemical Company)
- Swedish Orphan Biovitrum AB, Stockholm, Sweden).

*Soluciones*

- Ácido acético 0,1 M al 0,03% (0,3 mg/mL diluido en PBS)
- BSA 5% (50 mg/mL diluido en TBS-T)
- Cloruro de sodio 0,9%
- Colagenasa tipo II (2mg/mL disuelta en PBS).
- DMEM-0,1% BSA para 400 mL (4 g de medio M199, 1,48 g de NaHCO<sub>3</sub>, 400 mg FCS en BSA, 4 mL de glutamina (2 mM), 160  $\mu$ L penicilina (100 U/mL), 120  $\mu$ L estreptomina (100  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L de anfotericina (2,5  $\mu$ g/mL)).
- DMEM-10% para 450 mL (4 g de medio M199, 1,48 g de NaHCO<sub>3</sub>, 45 mL FCS, 4 mL de glutamina (2 mM), 178  $\mu$ L penicilina (100 U/mL), 133,5  $\mu$ L estreptomina (100  $\mu$ g/mL), 111  $\mu$ L de anfotericina (2,5  $\mu$ g/mL)).
- M199-10% FCS para 450 mL (3,84 g de medio M199, 0,88 g de NaHCO<sub>3</sub>, 45 mL FSC, 4 mL glutamina (2 mM), 178  $\mu$ L penicilina (100 U/mL), 133,5  $\mu$ L estreptomina (100

- µg/mL), 111 µL de anfotericina (2,5 µg/mL), 1100 µL suplemento para el crecimiento de las células endoteliales (EGCS, 25 µg/mL), 180 µL heparina (0,005%)
- M199-20% FCS para 500 mL (3,84 g de medio M199, 0,88 g de NaHCO<sub>3</sub>, 80 mL FCS, 4 mL glutamina (2 mM), 192 µL penicilina (100 U/mL), 144 µL estreptomycin (100 µg/mL), 120 µL de anfotericina (2,5 µg/mL), 1100 µL EGCS (25 µg/mL), 180 µL heparina (0,005%)
  - PBS 1L (0,2 g de KCl, 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g de NaCl, 1,144 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) llevar a pH 7.
  - Solución Kreb's con potasio 125 mM (115 mM de NaCl, 115,4 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 mM de EDTA Na<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O y 11,1 mM de glucosa).
  - Solución Kreb's Henseleit (KSH) (115 mM de NaCl, 4,6 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 mM de EDTA Na<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O y 11,1 mM de glucosa).
  - Solución madre de lucigenina 10<sup>-2</sup> M (0,51 mg de N,N'-dimetil-9,9'- dinitrato de biacridinio, 100 mL de PBS, 1 µL EDTA 0.1 M) a 37 °C.
  - Solución madre de β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 10<sup>-3</sup> M (8,334 mg en 10 mL de agua milliq).
  - Tampón de electroforesis 1X para 1 litro (20 mM Tris-base, 14,26 glicina, 1 g SDS, pH 8,3 – 8,8).
  - Tampón de homogenización (50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM de ácido etilenglicoltetraácetico (EGTA) y 150 mM sacarosa) a un pH de 7
  - Tampón de Laemmli 1X (125 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% glicerol, 1% β- mercaptoetanol, 1% azul de bromofenol, pH 6,8)
  - Tampón de lisis para células (50 nM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 2mM de EGTA, 0,2% Triton X-100, 0,3% NP-40 e inhibidores de proteasa (betaglicerofosfato, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, complete).
  - Tampón de lisis para tejido (50 nM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 2mM de EGTA, 0,2% Triton X-100, 0,3% NP-40 e inhibidores de proteasa (betaglicerofosfato, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, complete).
  - Tampón de transferencia para 1 litro (3,94 g Tris-HCl 14,26 g glicina, 200 mL metanol, 800 mL agua bidestilada).
  - TBS-T 1X (0,1M de NaCl, 0,01 M de Tris pH 7,5 y Tween 20 al 0,01%)
  - Tripsina 0,05% (0,5 mg/mL disuelta en PBS).
  - Triton X-100 0,1%



*Otros reactivos*

- Acetona (Panreac Quimica).
- Acido acético (Panreac Quimica).
- Anfotericina B (Cat # A4888-500MG, Sigma Aldrich).
- BCA protein assay (Cat # 23225, Thermo scientific)
- BSA (suero albúmina de bovino) 5% (Cat # A7906-100G, Sigma Aldrich).
- Carbógeno, CO<sub>2</sub> al 5% O<sub>2</sub> al 95% (Air liquide España C.P.G.E Alphagaz).
- Colagenasa tipo II (Cat # C6885-500MG, Sigma Aldrich).
- Colágeno tipo I (Cat # C9791--10MG, Sigma Aldrich).
- Complete (Cat # 11697498001, Sigma Aldrich).
- DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl)
- DMEM (Biological Industries, Beit-Haemek).
- ECL Select western blotting detection reagent (Cat # RPN2235, GE Healthcare).
- Estreptomina (1 g, Laboratorio Reig Jofré S.A.)
- Fluorocromo Alexa Fluor 488
- FSC (Cat # 04-007-1A, 500 mL, Biological Industries, Beit-Haemek).
- Heparina sodica (Cat # H3149-100KU, Sigma Aldrich).
- Imalgene, solución inyectable de ketamina 50 ng/mL (Merial).
- L-Glutamina (Cat # G7513-100mL, Sigma Aldrich).
- Medio 199 (Cat # 11-080-1M para 10L, Biological Industries, Beit-Haemek).
- Paraformaldehído
- Penicilina (Penilevel 1000000 U.I., Laboratorios ERN S.A.)
- ProLong
- Re -blot Plus Mild Solution (10X) Stripping (Cat # 2502, Millipore).
- Suero de cabra
- Suplemento para el crecimiento de las células endoteliales – EGCS (Cat # E2759—15 MG, Sigma Aldrich).
- Tripsina EDTA solución A (Cat # 03-050-1A, 500 mL, Biological industries).
- Triton X-100
- Xilagesic 2%, solución inyectable de xilacina (Laboratorios Calier S.A.).

## **IV RESULTADOS**

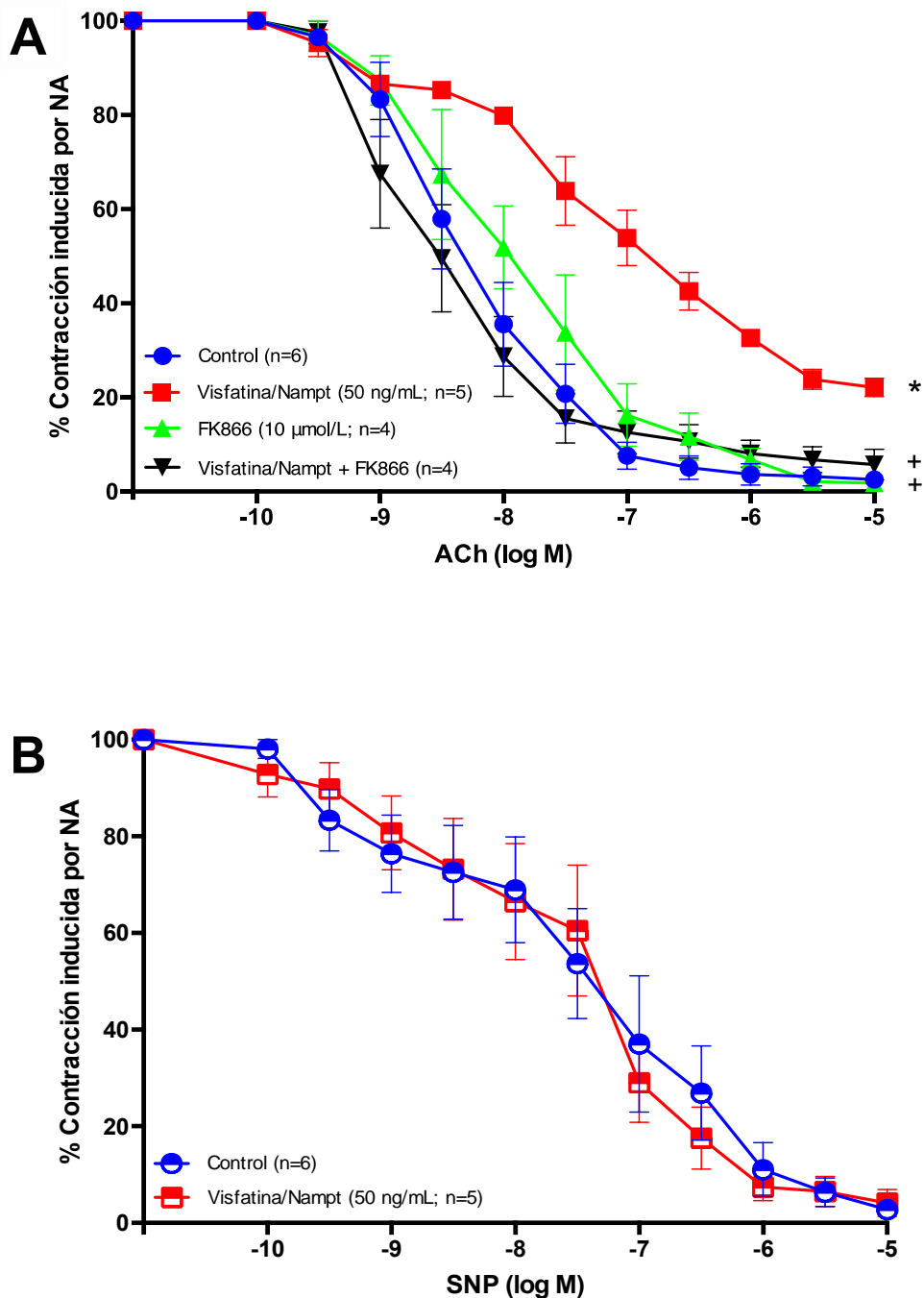
#### 4.1 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN MICROVASOS MESENTÉRICOS DE RATÓN PRODUCIDA POR VISFATINA/NAMPT

4.1.1 La administración de visfatina/Nampt *ex vivo* interfiere con las relajaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados de ratones controles C57BL/6 a través de su actividad enzimática Nampt y de otros mediadores, como ROS y prostanoïdes vasoconstrictores.

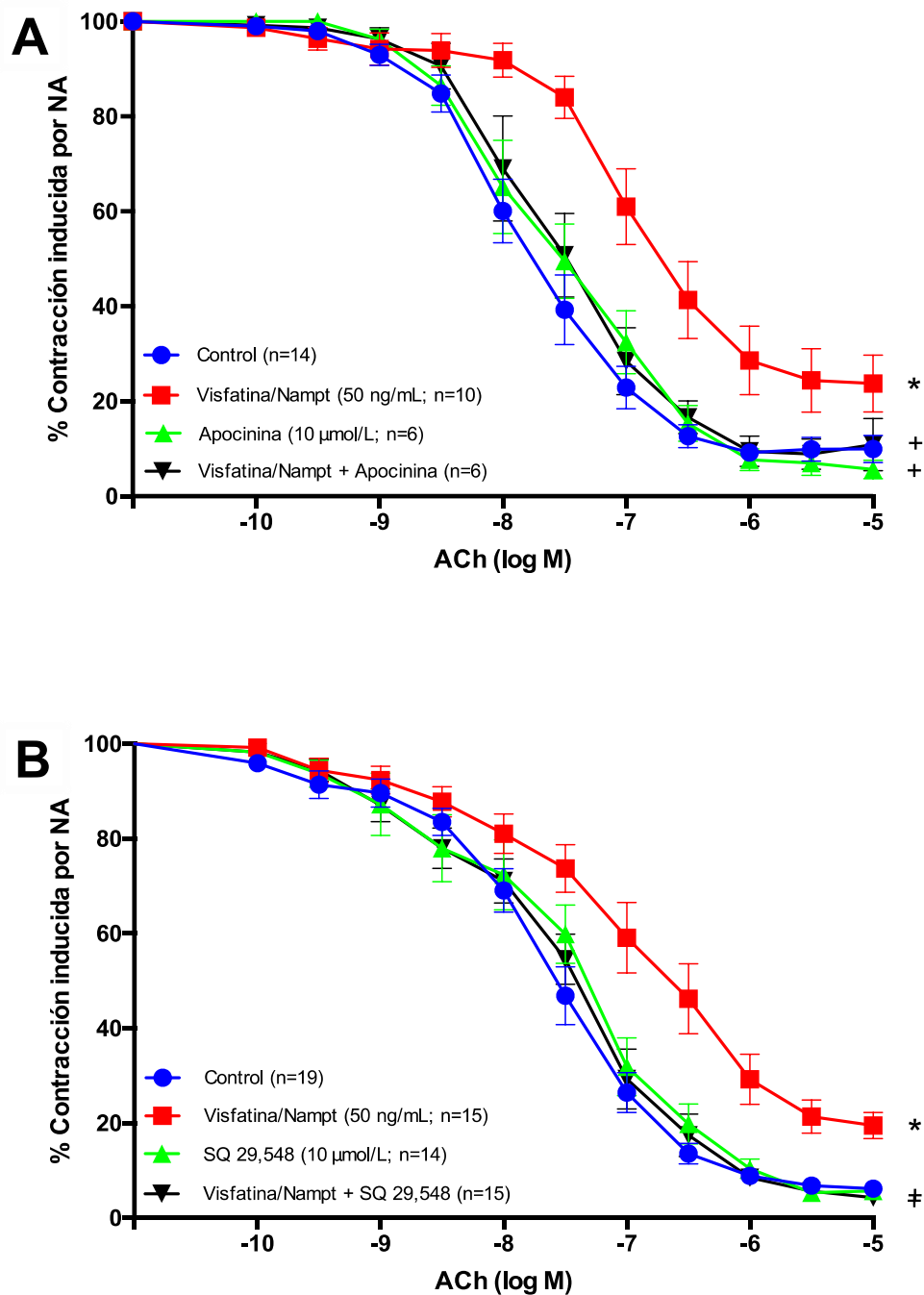
Para confirmar la interferencia producida por la visfatina/Nampt en las relajaciones vasculares de los microvasos arteriales mesentéricos de ratas u obtenidas de pacientes reportado por nuestro laboratorio (Vallejo et al., 2011), se aislaron microvasos arteriales mesentéricos procedentes de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento previo alguno, que fueron pre-incubados con visfatina/Nampt (50 ng/mL), para posteriormente, y siempre en presencia de visfatina/Nampt, registrar las contracciones con noradrenalina (NA, 3  $\mu\text{mol/L}$ ) y las relajaciones con concentraciones acumulativas de un vasodilatador dependiente de endotelio, acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ), o de un vasodilatador independiente de endotelio como nitroprusiato sódico (SNP, 1 nmol/L a 100  $\mu\text{mol/L}$ ). En estas condiciones, se observó una disminución significativa de las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh que se prevenía por el inhibidor específico de la actividad enzimática de Nampt (FK866; 10  $\mu\text{mol/L}$ ) (Fig. 13A). Por su parte, las relajaciones inducidas con SNP no se vieron afectadas por la visfatina/Nampt (Fig. 13B). Los respectivos valores de la  $p\text{EC}_{50}$  para ACh y SNP figuran en la Tabla 8.

Por otro lado, la disfunción endotelial producida por la visfatina/Nampt también fue revertida por la incubación previa con un inhibidor de NADPH oxidasa (apocinina, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) o con un antagonista del receptor TP (SQ 29.548, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), administrados antes de la administración de visfatina/Nampt y durante la curva a ACh (Fig. 14A y 14B). Los respectivos valores de la  $p\text{EC}_{50}$  para ACh en presencia de estos fármacos figuran en la Tabla 8.

Ninguno de los fármacos empleados modificó las respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA (Tabla 8). Además, ni FK866 (Fig 13A), ni apocinina o SQ 29.548 (Fig. 14A y 14B) modificaron las respuestas inducidas por ACh en ausencia de visfatina/Nampt. Los respectivos valores de la  $p\text{EC}_{50}$  para ACh en presencia de estos fármacos figuran en la Tabla 8.



**Figura 13.** La administración de visfatina/Nampt *ex vivo* interfiere con las relaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados de ratones controles a través de su actividad enzimática Nampt. **(A)** Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3 μmol/L de noradrenalina (NA) y sometidos a concentraciones acumulativas del vasodilatador dependiente de endotelio acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 10 μmol/L) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 50 ng/mL de visfatina/Nampt y/o 10 μmol/l de FK866; **(B)** Con un protocolo similar, se estudió el efecto de visfatina/Nampt sobre las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio inducidas por nitroprusiato sódico (SNP; 1 nmol/L a 100 μmol/L). Los datos (media ± ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tabla 8, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control. + $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.



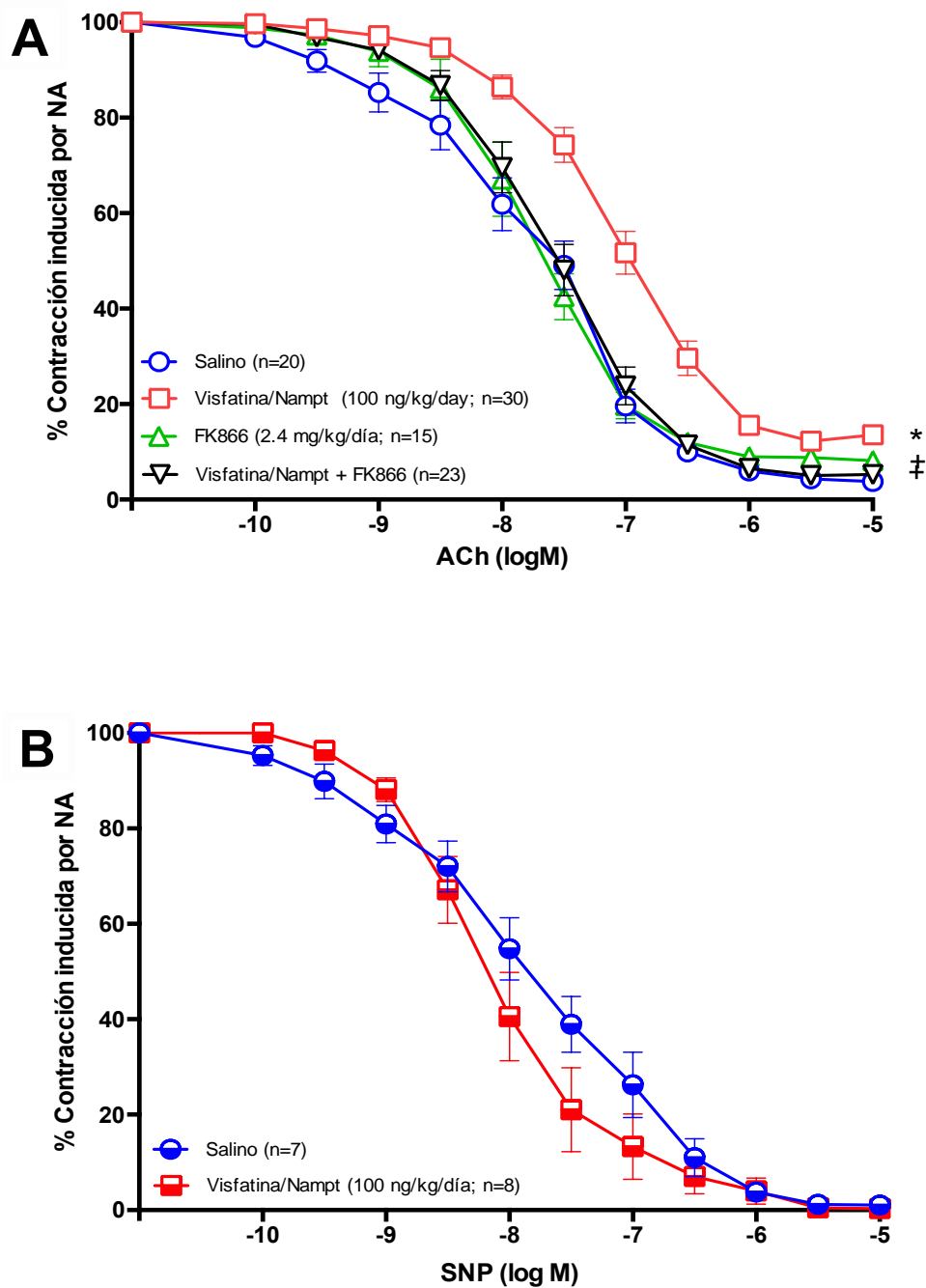
**Figura 14. El tratamiento *ex vivo* con apocinina o SQ 29,548 revierte la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt en microvasos mesentéricos de ratón. (A)** Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu$ mol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh (0,1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 50 ng/mL de visfatina/Nampt y/o 10  $\mu$ mol/L de apocinina; **(B)** Con el mismo protocolo, se analizaron los efectos de visfatina/Nampt y/o 10  $\mu$ mol/L de SQ 29,548 sobre la curva a ACh. Los datos (media  $\pm$  ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tabla 8, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control. † $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.

4.1.2 La administración de visfatina/Nampt en ratones C57BL/6 mediante infusión *in vivo* con mini-bombas osmóticas interfiere con las relajaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados, a través de su actividad enzimática Nampt y de otros mediadores, como ROS y prostanoïdes vasoconstrictores.

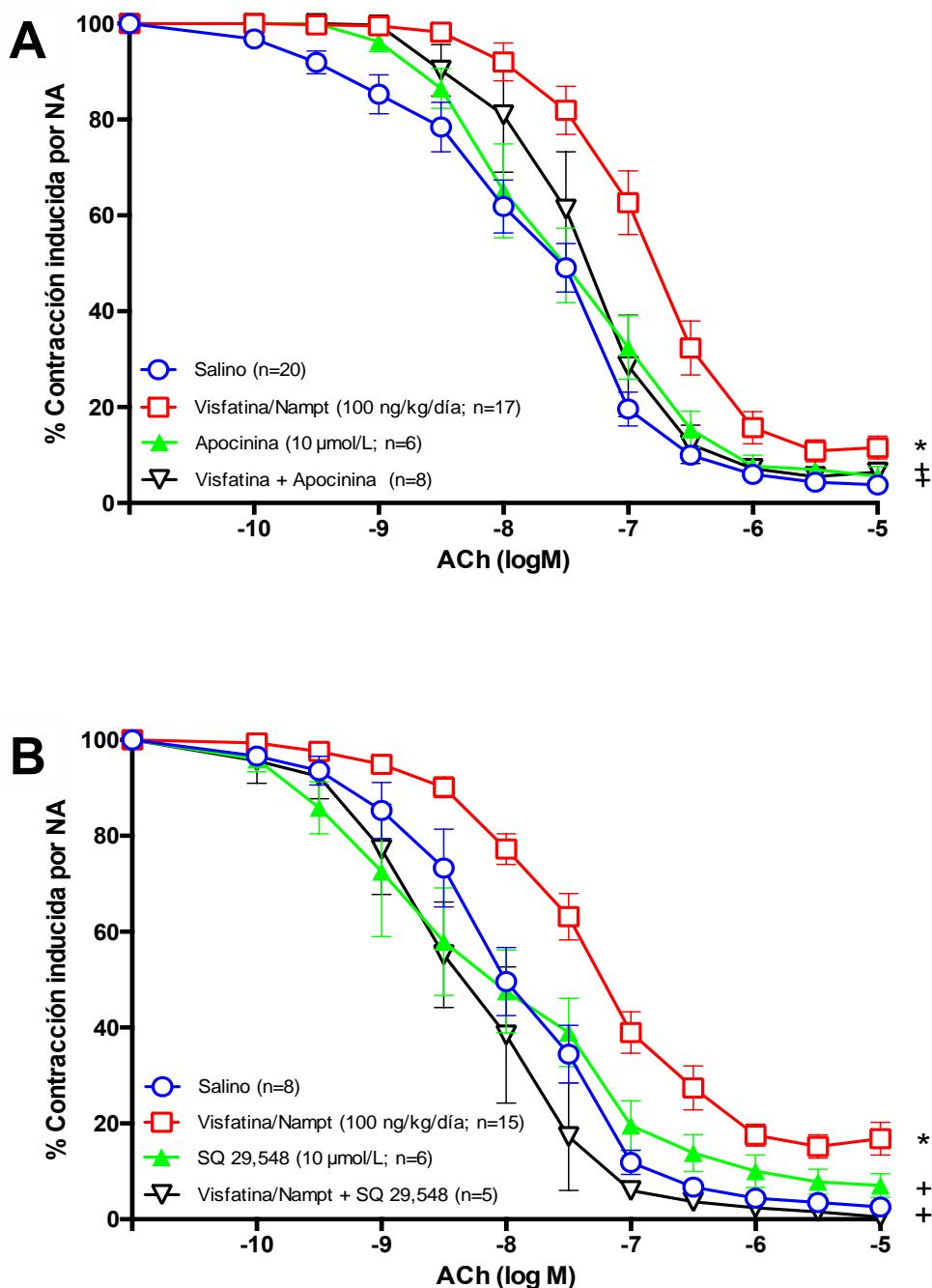
Una vez obtenidos los resultados anteriores *ex vivo*, se decidió estudiar los efectos de visfatina/Nampt *in vivo*. Para ello, se implantaron mini-bombas osmóticas con infusión constante de visfatina/Nampt (100 ng/kg/día) en ratones C57BL/6 durante siete días. Tras el sacrificio, se aislaron los microvasos arteriales mesentéricos y se registraron las contracciones inducidas con NA, las relajaciones dependientes de endotelio en respuesta a ACh y las no dependientes de endotelio frente a SNP. En este modelo experimental, se observó una disminución de las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh (Fig 15A), mientras que las relajaciones inducidas con SNP no se vieron afectadas por la infusión de visfatina/Nampt (Fig. 15B). De forma análoga a lo observado en los experimentos *ex vivo*, la infusión simultánea de FK866 (2.4 mg/kg/día) durante siete días mediante mini-bombas osmóticas previno el deterioro endotelial producido por la visfatina/Nampt (Fig. 15A). Los respectivos valores de la pEC<sub>50</sub> para ACh y SNP figuran en la Tabla 9.

Asimismo, se revirtió el deterioro endotelial cuando los segmentos arteriales procedentes de ratones infundidos con visfatina/Nampt fueron pre-incubados *ex vivo* con apocinina (10 µmol/L) o SQ 29.548 (10 µmol/L) (Fig. 16A y 16B). Los respectivos valores de la pEC<sub>50</sub> para ACh en presencia de estos fármacos figuran en la Tabla 9.

Ninguno de los fármacos empleados modificó las respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA ni las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio evocadas por SNP (Tabla 9). Además, ni FK866 (Fig. 15A), ni apocinina o SQ 29.548 (Fig. 15A y 16B) modificaron las respuestas inducidas por ACh en ausencia de visfatina/Nampt. Los respectivos valores de la pEC<sub>50</sub> para ACh en presencia de estos fármacos figuran en la Tabla 9.



**Figure 15.** La infusión *in vivo* de visfatina/Nampt en ratones mediante mini-bombas osmóticas interfiere con las relaciones dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos aislados a través de su actividad enzimática Nampt. Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6, mediante mini-bombas osmóticas, de solución salina, visfatina/Nampt (100 ng/kg/día), FK866 (2.4 mg/kg/día), o visfatina/Nampt más FK866, los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu\text{mol/L}$  de NA y sometidos a: **(A)** concentraciones acumulativas de ACh (0,1 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ); **(B)** concentraciones acumulativas de SNP (1 nmol/L a 100  $\mu\text{mol/L}$ ). Los datos (media  $\pm$  ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tabla 9, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control. † $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.



**Figure 16. El tratamiento *ex vivo* con apocinina o SQ 29,548 revierte la disfunción endotelial inducida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt.** Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6, mediante mini-bombas osmóticas, de solución salina o 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt, los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3 µmol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas del vasodilatador dependiente de endotelio ACh (0,1 nmol/L a 10 µmol/L). Adicionalmente, los segmentos arteriales fueron incubados *ex vivo* con **(A)** 10 µmol/L de apocinina o **(B)** 10 µmol/L de SQ 29,548. Los datos (media ± ES) se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indica en la Tabla 9, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva frente a la curva de solución salina. \* $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.

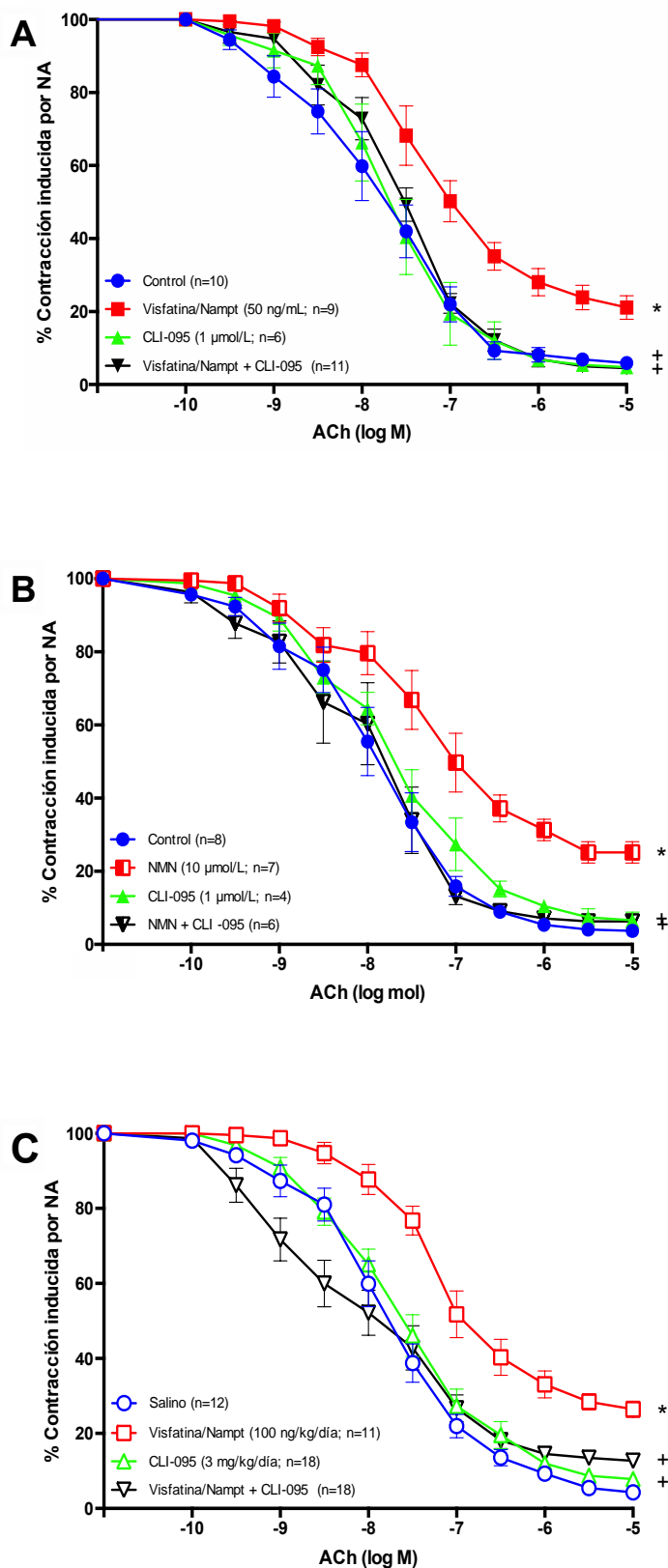


4.1.3 Visfatina/Nampt y NMN, el producto de la actividad Nampt, producen deterioro en las relajaciones vasculares inducidas por ACh en arterias mesentéricas de ratones a través de la activación del receptor TLR4.

Puesto que la visfatina/Nampt ha sido descrita como un posible agonista del receptor TLR4 (Camp et al., 2015), el inhibidor específico del este receptor (CLI-095, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) se administró *ex vivo* antes y durante la incubación con visfatina/Nampt (50 ng/mL) en microvasos mesentéricos aislados de ratones C57BL/6 controles. Efectivamente, en presencia de CLI-095 no se observó la disfunción endotelial producida por la visfatina/Nampt (Fig. 17A). Resultados análogos se obtuvieron con NMN, el producto de la actividad enzimática de Nampt. Este indujo una reducción de las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh que fue antagonizada por el tratamiento previo de los segmentos con CLI-095 (Fig. 17B).

Para comprobar si estos efectos de CLI-095 se observaban también *in vivo*, un grupo de ratones infundidos con visfatina/Nampt durante siete días recibieron simultáneamente dosis diarias de CLI-095 (3 mg/kd/día) administradas intraperitonealmente. Mediante este abordaje experimental, se comprobó que la disfunción endotelial producida *in vivo* por visfatina/Nampt también se revertía cuando los animales eran tratados con el antagonista de TLR4 (Fig. 17C). Los resultados obtenidos fueron similares *in vitro* e *in vivo*. Los respectivos valores de la  $\text{pEC}_{50}$  para ACh figuran en la Tabla 9.

Adicionalmente, se comprobó que la administración de CLI-095 *in vivo* no modificó la contractilidad a NA o la vasodilatación inducida por SNP (Tabla 9), así como tampoco las respuestas a ACh en animales infundidos con suero salino (Fig. 17C). Los respectivos valores de la  $\text{pEC}_{50}$  para ACh figuran en la Tabla 9.



**Figure 17.** El tratamiento con CLI-095, tanto *ex vivo* como *in vivo*, previene la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt o mononucleótido de nicotinamida (NMN), el producto de la actividad enzimática Nampt. **(A)** Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu$ mol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh, (0,1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 50 ng/mL de visfatina/Nampt y/o 1  $\mu$ mol/l de CLI-095; **(B)** Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu$ mol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh, en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 10  $\mu$ mol/L de NMN y/o 1  $\mu$ mol/l de CLI-095; **(C)** Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6 de solución salina o 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt mediante mini-bombas osmóticas y/o la administración intraperitoneal de 3 mg/kg/día de CLI-095, los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu$ mol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh. Los datos (media  $\pm$  ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tablas 8 y 9, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control o con solución salina. \* $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.

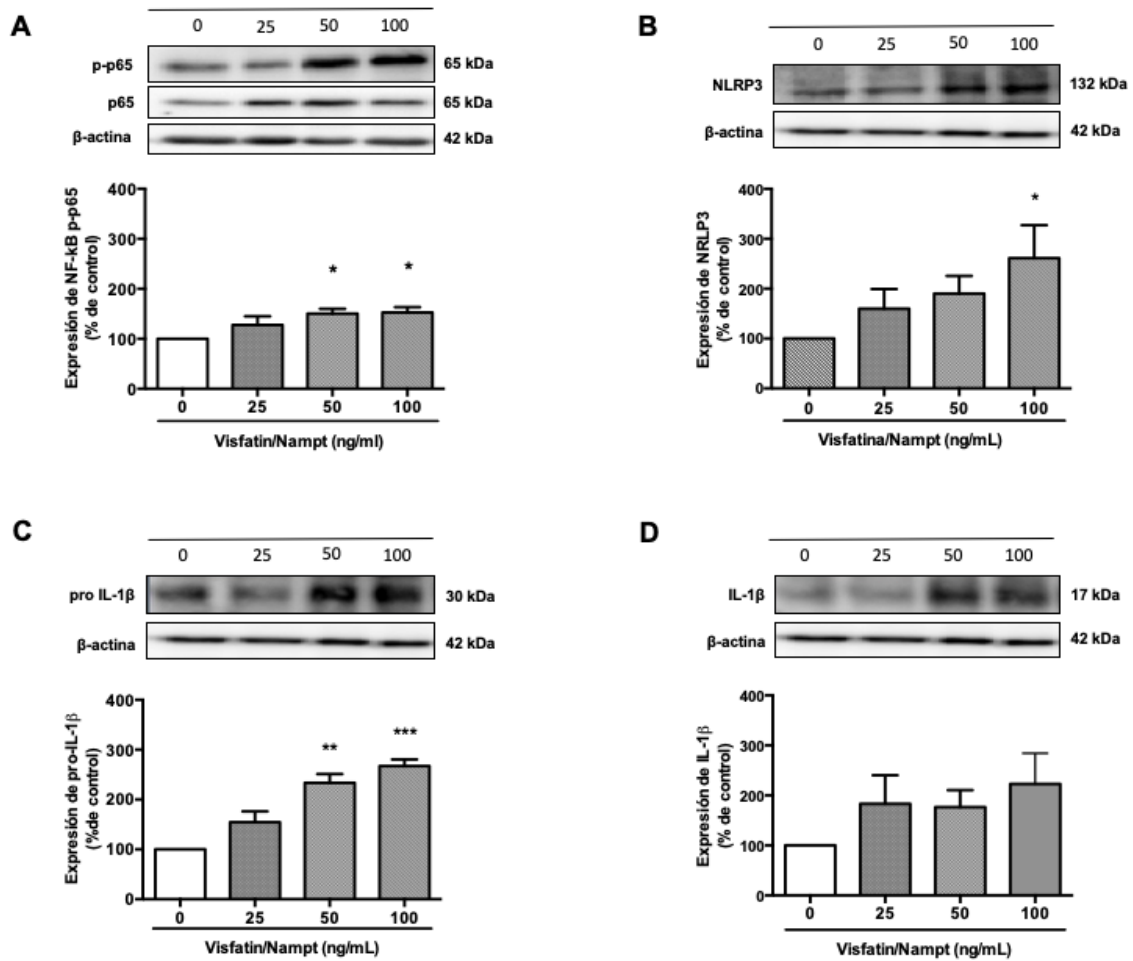
## 4.2 ACTIVACIÓN DE VÍAS PRO-INFLAMATORIAS PRODUCIDA POR VISFATINA/NAMPT EN HUVEC CULTIVADAS

### 4.2.1 El tratamiento de HUVEC cultivadas con visfatina/Nampt induce la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión del inflammasoma NLRP3, así como de pro-IL-1 $\beta$

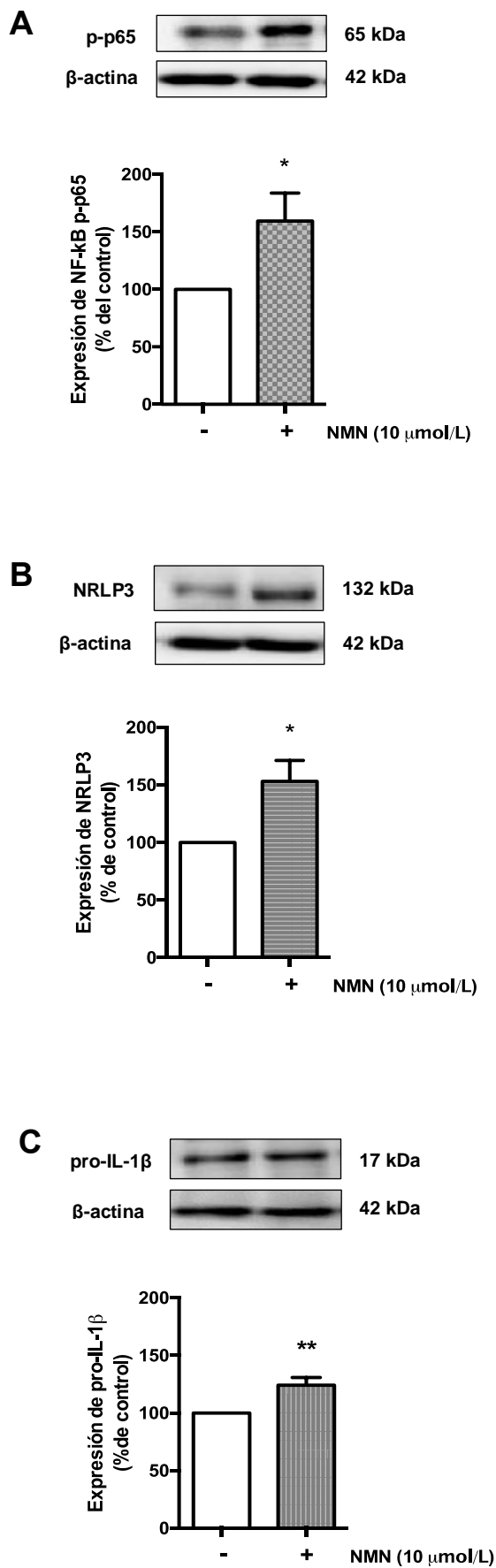
En cultivos de HUVEC confluentes expuestas a concentraciones crecientes de visfatina/Nampt (25, 50 y 100 ng/mL) durante 18 horas se cuantificó mediante Western blot la expresión de la subunidad p-65 fosforilada (p-p65) como medida de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Con este protocolo, se observó un aumento significativo de los niveles de p-p65 que fue dependiente de la concentración de visfatina/Nampt administrada (Fig. 18A). Como control positivo de la inducción se utilizó la adipocitoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) (datos no mostrados).

Adicionalmente, se analizó si, además de la activación de NF- $\kappa$ B, la visfatina/Nampt podía desencadenar la activación del inflammasoma, para lo que se determinó la respectiva expresión de NLRP3, pro-IL-1 $\beta$  e IL-1 $\beta$  madura (Man y Kanneganti, 2015). Con el protocolo descrito, los niveles de NLRP3 y pro-IL-1 $\beta$  aumentaron de manera dependiente de la concentración de visfatina/Nampt (Fig. 18B y 18C), mientras que los niveles de IL-1 $\beta$  madura no se modificaron de forma significativa (Fig. 18D). En todos los casos, se utilizó IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) como control positivo (datos no mostrados). Paralelamente, se realizaron experimentos con NMN, el producto de la actividad enzimática Nampt (10  $\mu$ mol/L), que también indujo un incremento significativo de la expresión de p-p65, NLRP3, y pro-IL-1 $\beta$  (Fig. 19A, 19B y 19C).

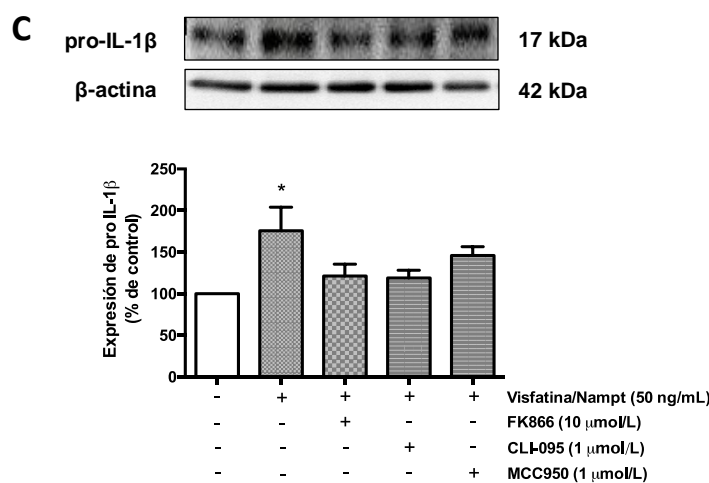
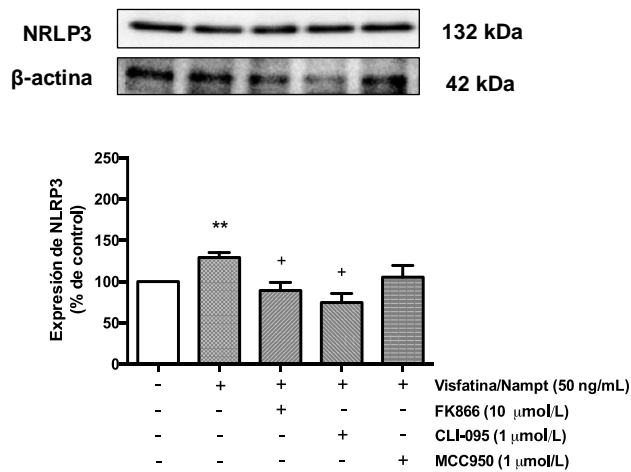
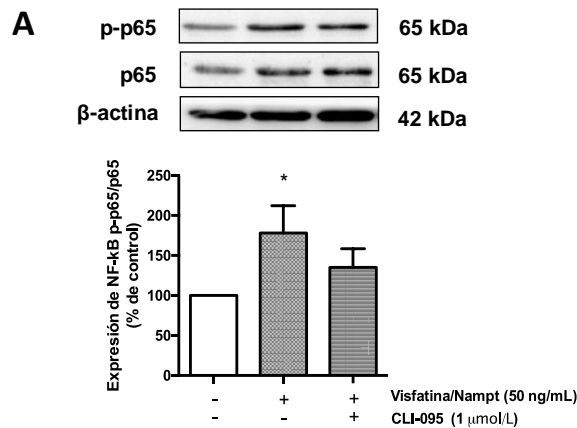
Posteriormente se analizó en qué medida la expresión de los parámetros pro-inflamatorios inducidos por visfatina/Nampt se afectaba por el bloqueo de la actividad Nampt con FK866 (10  $\mu$ mol/L), el antagonismo de los receptores TLR4 con CLI-095 (1  $\mu$ mol/L) o la interferencia con la formación del inflammasoma NLRP3 mediante MCC950 (1  $\mu$ mol/L). En estos experimentos, la expresión de p-p65 inducida por 50 ng/mL de visfatina/Nampt tendía a ser menor en presencia de CLI-095 sin llegar a observarse cambios estadísticamente significativos (Fig. 20A). Por su parte, la expresión de NLRP3 se redujo tras el tratamiento de las HUVEC con FK866 y CLI-095, mientras que en presencia de MCC950 no hubo cambios estadísticamente significativos (Fig. 20B). En el caso de la expresión de pro-IL-1 $\beta$  inducida visfatina/Nampt no hubo cambios estadísticamente significativos con FK866, CLI-095 o MCC950, aunque en los dos primeros casos también hubo una tendencia a la disminución (Fig. 20C). En ausencia de visfatina/Nampt, la administración de FK866, CLI-095 o MCC950 no indujo cambios significativos en la expresión de p-p65, NLRP3 o pro-IL-1 $\beta$  (datos no mostrados).



**Figura 18. Expresión de p-p65, NLRP3, pro-IL-1 $\beta$  e IL-1 $\beta$  madura en HUVEC tratadas con visfatina/Nampt.** Los cultivos de HUVEC fueron expuestos a diferentes concentraciones de visfatina/Nampt (25, 50 y 100 ng/mL) durante 18 h y se cuantificó por Western blot la expresión de distintas proteínas. **(A)** Subunidad fosforilada de la p65 (p-p65), como medida de la activación de NF- $\kappa$ B; **(B)** NLRP3; **(C)** pro-IL-1 $\beta$ ; **(D)** IL-1 $\beta$  madura. Los resultados se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la cantidad de proteína respectiva observada en condiciones basales. Cada histograma representa al menos cuatro experimentos independientes \* $p < 0.05$  frente a basal.



**Figura 19. Expresión de p-p65, NLRP3 y pro-IL-1 $\beta$  en HUVEC tratadas con NMN.** Los cultivos de HUVEC fueron expuestos 10  $\mu$ mol/L de NMN durante 18 h y se cuantificó por Western blot la expresión de distintas proteínas. **(A)** Subunidad fosforilada de la p65 (p-p65), como medida de la activación de NF-kB; **(B)** NLRP3; **(C)** pro-IL-1 $\beta$ . Los resultados se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la cantidad de proteína respectiva observada en condiciones basales. Cada histograma representa al menos cuatro experimentos independientes \* $p$ <0.05 frente a basal.

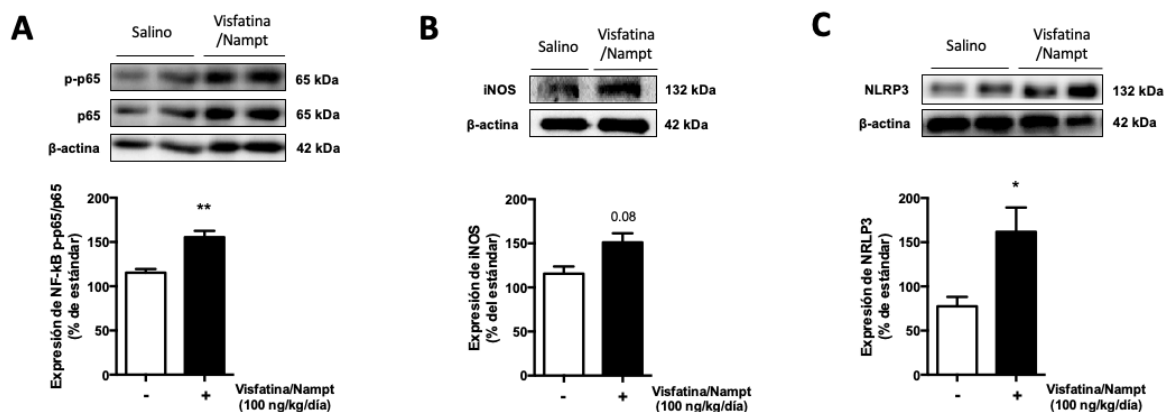


**Figura 20. Efecto de FK866, CLI-095 y MCC950 sobre la expresión de p-p65, NLRP3 y pro-IL-1β inducidos por visfatina/Nampt.** Los cultivos de HUVEC fueron expuestos a 50 ng/mL de visfatina/Nampt durante 18 h y se cuantificó la expresión de distintas proteínas. **(A)** p-p65, en presencia de 10 μmol/L de FK866 o 1 μmol/L de CLI-095; **(B)** NLRP3, en presencia de 10 μmol/L de FK866, 1 μmol/L de CLI-095 o 1 μmol/L de MCC950; **(C)** pro-IL-1β; en presencia de 10 μmol/L de FK866, 1 μmol/L de CLI-095 o 1 μmol/L de MCC950. Los resultados se expresan (media ± ES) como el porcentaje de la cantidad de proteína respectiva observada en condiciones basales. Cada histograma representa al menos cuatro experimentos independientes \*p<0.05 frente a basal; p<0.05 frente a visfatina/Nampt.

### 4.3 ACTIVACIÓN DE VÍAS PRO-INFLAMATORIAS EN LA PARED VASCULAR AÓRTICA DE RATONES INFUNDIDOS CON VISFATINA/NAMPT

4.3.1 La administración de visfatina/Nampt en ratones mediante infusión *in vivo* con mini-bombas osmóticas induce la expresión de p-p65, la enzima pro-inflamatoria iNOS y el inflammasoma NLRP3 en la pared aórtica.

En homogenados de la pared aórtica de ratones C57BL/6 infundidos durante siete días con visfatina/Nampt, se cuantificó mediante Western blot la expresión de la subunidad p-p65, que se incrementó de modo significativo (Fig. 21A). Respecto a la expresión de la enzima pro-inflamatoria iNOS, se observó una tendencia al aumento que no alcanzó significancia estadística (Fig. 21B). Como tercer indicador de inflamación, se determinó la expresión del inflammasoma NLRP3, que aumentó significativamente respecto de los animales infundidos con suero salino (Fig. 21C).



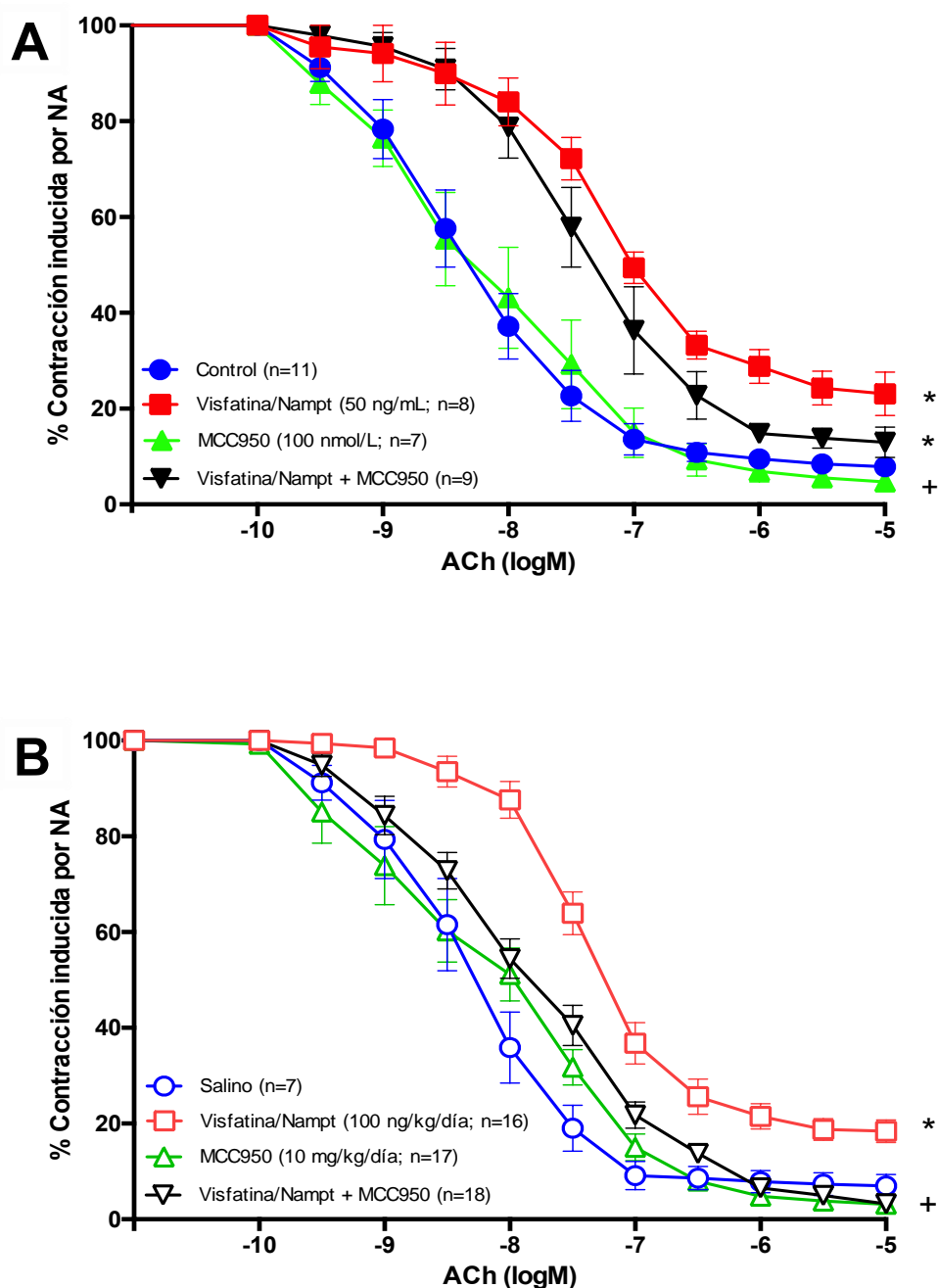
**Figure 21. Expresión de p-p65 y NLRP3 en la pared aórtica de animales infundidos con visfatina/Nampt.** Tras la infusión en ratones C57BL/6 de solución salina o 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt mediante mini-bombas osmóticas durante siete días, la pared aórtica fue aislada y homogenizada y se cuantificó mediante Western blot la expresión de distintas proteínas. **(A)** p-p65, como medida de la activación de NF- $\kappa$ B; **(B)** iNOS; **(C)** Inflammasoma NLRP3. Los resultados se expresan (media  $\pm$  ES) como el porcentaje de la cantidad de proteína respectiva observada animales tratados con suero salino. Cada histograma representa al menos cuatro experimentos independientes \* $p < 0.05$  frente a suero salino.

#### 4.4 PARTICIPACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL INDUCIDA POR VISFATINA/NAMPT EN MICROVASOS MESENTÉRICOS DE RATÓN

4.4.1 La administración intraperitoneal de MCC950 previene la disfunción endotelial producida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt, mientras que la incubación de los segmentos arteriales con MCC950 no modifica los efectos *ex vivo* de la adipocina.

Tras la observación de que la visfatina/Nampt era capaz de activar el inflammasoma en cultivos de HUVEC, se investigó la posibilidad de que este mecanismo pudiera participar en la disfunción endotelial producida por esta adipocina. En unos experimentos, se indujo disfunción endotelial mediante la incubación *ex vivo* de microvasos mesentéricos aislados de ratones C57BL/6 controles y sin tratamiento previo con 50 ng/mL de visfatina/Nampt y, paralelamente, algunos segmentos se trataron previamente, también *ex vivo*, con MCC950 (100 nmol/L), lo que no modificó significativamente la disfunción endotelial (Fig. 22A). En un segundo abordaje, los animales fueron infundidos con 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt durante siete días mediante mini-bombas osmóticas y en los días 2, 4 y 6 recibieron la administración intraperitoneal de MCC950 (10/mg/kg). En estas circunstancias, la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt se revirtió en su práctica totalidad, de modo que la curva a ACh era similar a la observada en ausencia de visfatina/Nampt (Fig. 22B). El tratamiento con MCC950 no modificó las respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA (Tabla 8 y 9), ni las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio evocadas por SNP (Tabla 9).

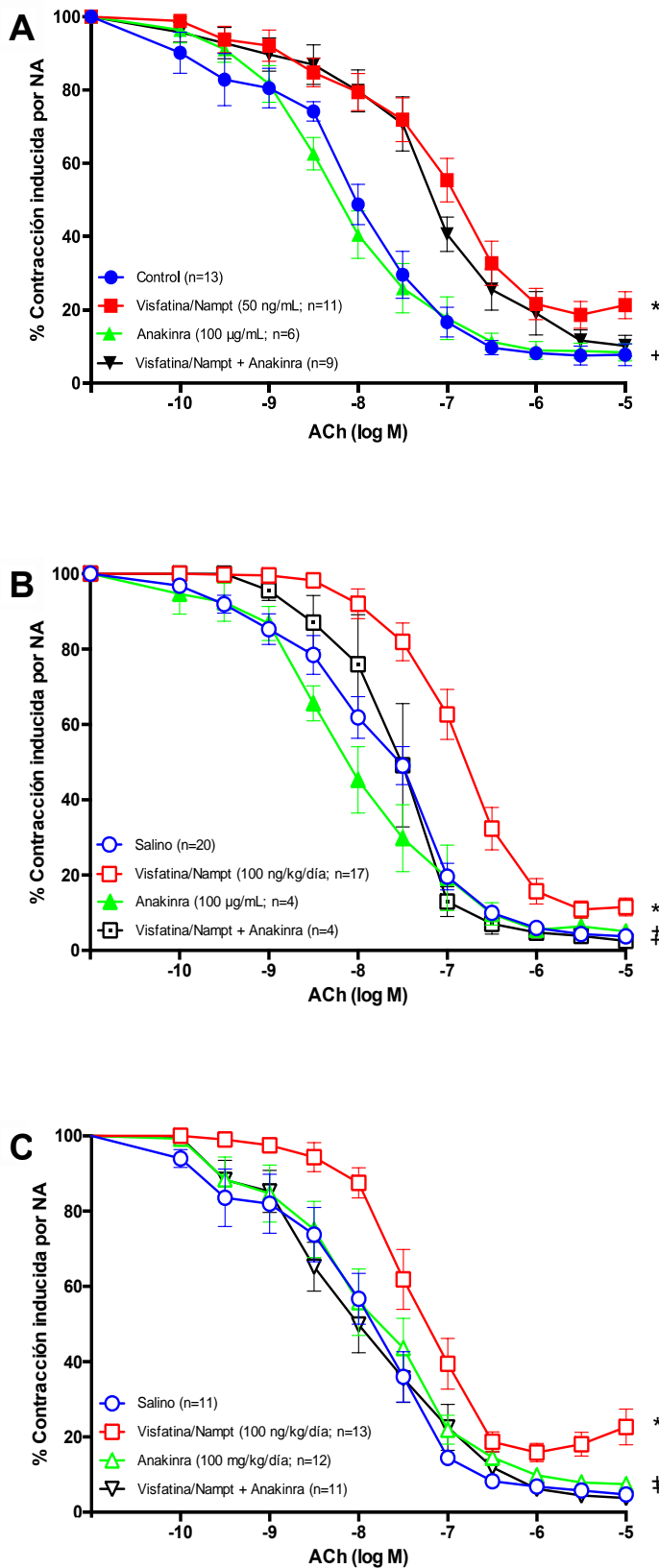




**Figure 22.** El tratamiento con MCC950 previene la disfunción endotelial inducida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt mientras que no modifica los efectos de su administración *ex vivo*. **(A)** Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu\text{mol/L}$  de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh, (10 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 50 ng/mL de visfatina/Nampt y/o 100 nmol/L de MCC950; **(B)** Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6 de solución salina o 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt mediante mini-bombas osmóticas y/o la administración intraperitoneal los días 2, 4 y 6 de 10 mg/kg de MCC950, los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu\text{mol/L}$  de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh. Los datos (media  $\pm$  ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tablas 8 y 9, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control o con solución salina. \* $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.

4.4.2 La administración intraperitoneal de anakinra previene la disfunción endotelial producida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt, mientras que la incubación de los segmentos arteriales con anakinra no modifica los efectos *ex vivo* de la adipoquina.

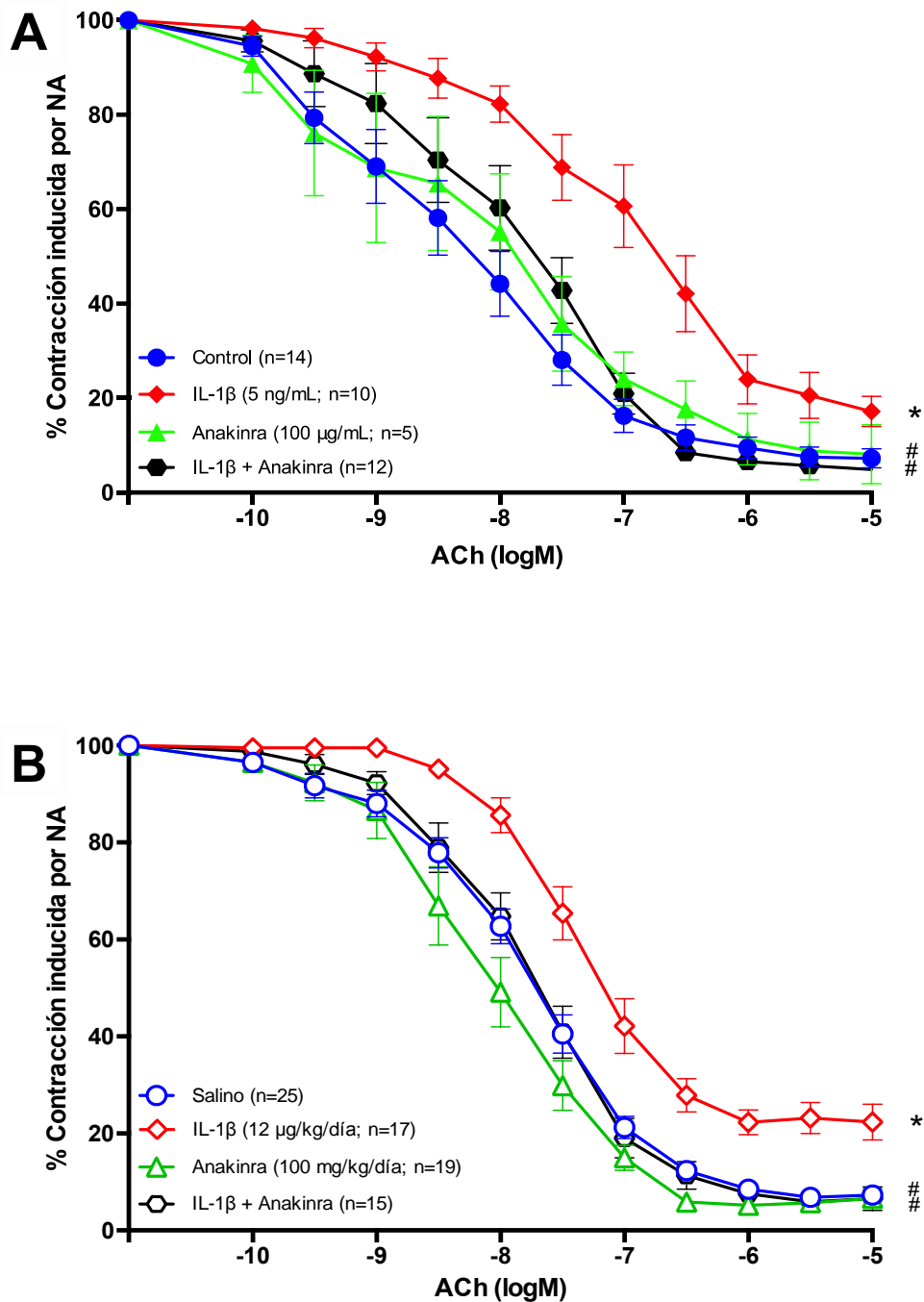
Para confirmar la participación del inflamasoma en la disfunción endotelial producida por visfatina/Nampt, se estudió la posible participación de los receptores para IL-1 mediante un antagonista recombinante como anakinra. De nuevo, se diseñó un primer abordaje *ex vivo* en microvasos mesentéricos aislados de ratones C57BL/6 controles incubados con 50 ng/mL de visfatina/Nampt para inducir disfunción endotelial. El tratamiento previo de los segmentos vasculares *ex vivo* con *vivo* con anakinra (100 µg/mL) no modificó significativamente el deterioro de las relajaciones dependientes de endotelio producidas por la visfatina/Nampt (Fig. 23A). En una segunda aproximación, la visfatina/Nampt se infundió *in vivo* durante siete días con mini-bombas osmóticas, lo que inducía disfunción endotelial en microvasos mesentéricos obtenidos de estos animales, que desaparecía cuando estos vasos se incubaron previamente *ex vivo* con anakinra antes de la curva concentración-respuesta a ACh (Fig. 23B). En un tercer abordaje, los ratones infundidos con visfatina/Nampt durante siete días recibieron intraperitonealmente anakinra (100 mg/kg) los últimos 3 días previos al sacrificio; en los microvasos obtenidos de estos animales tampoco se observó disfunción endotelial significativa (Fig. 23C). El tratamiento con anakinra no modificó las respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA (Tabla 8 y 9), ni las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio evocadas por SNP (Tabla 9).



**Figura 23. El tratamiento con anakinra previene la disfunción endotelial inducida por la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt mientras que no modifica los efectos de su administración *ex vivo*.** (A) Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3 µmol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh, (0,1 nmol/L a 10 µmol/L) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 50 ng/mL de visfatina/Nampt y/o 100 µg/mL de anakinra; (B) Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6 de solución salina o 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt mediante mini-bombas osmóticas, los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3 µmol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir *ex vivo* 100 µg/mL de anakinra; (C) Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6 de solución salina o 100 ng/kg/día de visfatina/Nampt mediante mini-bombas osmóticas y/o la administración intraperitoneal los días 4, 5 y 6 de 100 mg/kg de anakinra, los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3 µmol/L de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh. Los datos (media ± ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tablas 8 y 9, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control o con solución salina. † $p < 0.05$  frente a la visfatina/Nampt.

4.4.3 Tanto la incubación de los segmentos arteriales con anakinra como su administración intraperitoneal previene la disfunción endotelial producida por IL-1 $\beta$  *ex vivo* o *in vivo*.

Para confirmar la capacidad de anakinra como antagonista de los receptores para IL-1, se realizaron experimentos con IL-1 $\beta$ , ya que datos previos de nuestro grupo han demostrado su capacidad para inducir disfunción endotelial (Vallejo et al., 2014). Una vez más, se emplearon dos abordajes distintos. Por una parte, se incubaron segmentos vasculares *ex vivo* con IL-1 $\beta$  (5 ng/mL) y/o anakinra (100  $\mu$ g/mL). Por otra, se administró *in vivo* IL-1 $\beta$  (12  $\mu$ g/kg/día) durante siete días, mediante mini-bombas osmóticas, así como anakinra intraperitoneal (100 mg/kg) en los 3 últimos días previos al sacrificio. En ambos procedimientos se observó una disminución significativa de las relajaciones a ACh dependientes de endotelio inducida por IL-1 $\beta$ , que era completamente revertida por anakinra (Fig. 24A y 24B). Los tratamientos con IL-1 $\beta$  y/o anakinra, tanto *ex vivo* como *in vivo*, no modificaron las respuestas vasoconstrictoras inducidas por NA, ni las vasodilatadoras independientes de endotelio evocadas por SNP (Tablas 8 y 9).



**Figura 24. La administración de IL-1 $\beta$ , tanto *ex vivo* como *in vivo*, produce disfunción endotelial que es antagonizada por anakinra. (A) Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu\text{mol/L}$  de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh, (10 nmol/L a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o tras recibir 5 ng/mL de IL-1 $\beta$  y/o 100  $\mu\text{g/mL}$  de anakinra; (B) Tras la infusión durante siete días en ratones C57BL/6 de solución salina o 12  $\mu\text{g/kg/día}$  de IL-1 $\beta$  mediante mini-bombas osmóticas y/o la administración intraperitoneal los días 4, 5 y 6 de 100 mg/kg de anakinra; los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu\text{mol/L}$  de NA y sometidos a concentraciones acumulativas de ACh. Los datos (media  $\pm$  ES) de cada curva se expresan en porcentaje de la respectiva contracción previa a NA, que se indican en la Tablas 8 y 9, así como el número de segmentos y animales utilizados. \* $p < 0.05$  frente a la curva control o con solución salina. # $p < 0.05$  frente a IL-1 $\beta$ .**

**Tabla 8.** Los microvasos mesentéricos de ratones C57BL/6 sanos y sin tratamiento alguno fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu\text{mol/L}$  de noradrenalina (NA) y sometidos a concentraciones acumulativas del vasodilatador dependiente de endotelio acetilcolina (ACh, 10  $\text{nmol/L}$  a 10  $\mu\text{mol/L}$ ) en ausencia de cualquier otro tratamiento (control) o con los distintos fármacos indicados administrados *ex vivo*. Con un protocolo similar, se estudiaron las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio inducidas por nitroprusiato sódico (SNP; 1  $\text{nmol/L}$  a 100  $\mu\text{mol/L}$ ). En la tabla figuran los valores del tono previo inducido por NA, tanto en mNewtons (mN) como la respectiva contracción evocada por 125  $\text{mmol/L}$  de KCl. Asimismo, se indican los respectivos  $\text{pEC}_{50}$  para las relajaciones inducidas con ACh o SNP. La  $\text{pEC}_{50}$  se define como  $-\log \text{mol/L}$  de la concentración requerida para obtener el 50% de la relajación máxima. Los datos expresan la media  $\pm$  ES. El número de segmentos arteriales y animales utilizados se describen entre paréntesis en cada caso (s=segmentos, r=ratones). El análisis estadístico se realizó mediante t de Student no pareada. \* $p < 0.05$  frente a su respectivo control; † $p < 0.05$  frente a visfatina/Nampt; # $p < 0.05$  frente a IL-1 $\beta$ .

Tratamientos	Respuesta a NA (mN)	% NA con respecto a KCl	$\text{pEC}_{50}$ para ACh
Control (s=86, r=53)	6.12 $\pm$ 0.22	92.93 $\pm$ 1.99	7.91 $\pm$ 0.07
Visfatina/Nampt (50 ng/mL; s=61, r=38)	5.40 $\pm$ 0.27	97.67 $\pm$ 2.74	6.92 $\pm$ 0.22*
NMN (10 $\mu\text{mol/L}$ ; s=7, r=4)	6.17 $\pm$ 0.51	99.36 $\pm$ 3.29	7.16 $\pm$ 0.18*
FK866 (10 $\mu\text{mol/L}$ ; s=4, r=3)	3.48 $\pm$ 0.91	83.82 $\pm$ 19.20	7.80 $\pm$ 0.27
Apocinina (10 $\mu\text{mol/L}$ , s=5, r=5)	5.00 $\pm$ 0.71	83.33 $\pm$ 8.55	7.46 $\pm$ 0.22
SQ 29,548 (10 $\mu\text{mol/L}$ ; s=14, r=11)	3.93 $\pm$ 0.44	90.34 $\pm$ 12.71	7.35 $\pm$ 0.53
CLI-095 (1 $\mu\text{mol/L}$ ; s=10, r=8)	5.63 $\pm$ 0.65	92.09 $\pm$ 8.56	7.61 $\pm$ 0.13
MCC950 (100 $\text{nmol/L}$ ; s=6, r=3)	5.72 $\pm$ 0.44	97.26 $\pm$ 7.44	8.04 $\pm$ 0.26
Anakinra (100 $\mu\text{g/mL}$ ; s=11, r=10)	6.04 $\pm$ 0.68	94.26 $\pm$ 9.40	8.01 $\pm$ 0.22
Visfatina/Nampt + FK866 (s=4, r=3)	3.81 $\pm$ 0.96	61.50 $\pm$ 7.13	8.63 $\pm$ 0.22†
Visfatina/Nampt + Apocinina (s=6, r=6)	4.96 $\pm$ 0.47	83.95 $\pm$ 5.42	7.42 $\pm$ 0.20†
Visfatina/Nampt + SQ 29,548 (s=15, r=10)	6.04 $\pm$ 3.50	87.22 $\pm$ 3.50	7.45 $\pm$ 0.51†
Visfatina/Nampt + CLI-095 (s=11, r=6)	4.11 $\pm$ 0.65	95.80 $\pm$ 8.46	7.65 $\pm$ 0.15†
NMN + CLI-095 (s=6, r=4)	5.33 $\pm$ 0.83	87.27 $\pm$ 4.44	7.56 $\pm$ 0.20
Visfatina/Nampt + MCC950 (s=5, r=3)	5.56 $\pm$ 0.57	102.82 $\pm$ 7.55	7.33 $\pm$ 0.22*
Visfatina/Nampt + Anakinra (s=9, r=6)	6.04 $\pm$ 0.36	100.71 $\pm$ 6.86	7.07 $\pm$ 0.20*
IL-1 $\beta$ (5 ng/mL; s=7, r=8)	5.01 $\pm$ 0.64	88.00 $\pm$ 10.66	7.17 $\pm$ 0.41*
IL-1 $\beta$ + Anakinra (s=7, r=8)	5.44 $\pm$ 0.63	91.73 $\pm$ 9.97	7.84 $\pm$ 0.25#

Tabla 8. Continuación

Tratamientos	Respuesta a NA (mN)	%NA con respecto a K <sup>+</sup>	pEC <sub>50</sub> para SNP
Control (s=14, r=6)	4.38 ± 0.69	78.95 ± 6.37	7.11 ± 0.22
IL-1β (5 ng/mL; s=9, r=3)	4.48 ± 0.43	91.31 ± 7.19	7.68 ± 0.19
Visfatina/Nampt (50 ng/mL; n=5, r=3)	5.13 ± 0.72	92.50 ± 16.82	6.56 ± 0.33

**Tabla 9.** Tras la infusión durante 7 días en ratones C57BL/6, mediante mini-bombas osmóticas, de solución salina, visfatina/Nampt, FK866, visfatina/Nampt más FK866 e IL-1 $\beta$ , y/o CLI-095, MCC950 o anakinra por vía intraperitoneal. Los microvasos mesentéricos fueron aislados y montados en un miógrafo, contraídos con 3  $\mu$ mol/L de noradrenalina (NA) y sometidos a concentraciones acumulativas del vasodilatador dependiente de endotelio acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 10  $\mu$ mol/L). En algunos casos, se trataron con los distintos fármacos indicados administrados *ex vivo*. Con un protocolo similar, se estudiaron las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio inducidas por nitroprusiato sódico (SNP; 1 nmol/L a 100  $\mu$ mol/L). En la tabla figuran los valores del tono previo inducido por NA, tanto en mNewtons (mN) como la respectiva contracción evocada por 125 mmol/L de KCl. Asimismo, se indican los respectivos pEC<sub>50</sub> para las relajaciones inducidas con ACh o SNP. La pEC<sub>50</sub> se define como  $-\log$  mol/L de la concentración requerida para obtener el 50% de la relajación máxima. Los datos expresan la media  $\pm$  ES. El número de segmentos arteriales y animales utilizados se describen entre paréntesis en cada caso (s=segmentos, r=ratones). El análisis estadístico se realizó mediante t de Student no pareada. \*p< 0.05 frente a su respectivo control; \*p<0.05 frente a visfatina/Nampt; #p< 0.05 frente a IL-1 $\beta$ .

Tratamientos	Respuesta a NA (mN)	%NA con respecto a KCL	pEC <sub>50</sub> para ACh
Salino (12 $\mu$ L/día; n=75, r=25)	5.64 $\pm$ 0.23	94.86 $\pm$ 2.55	7.79 $\pm$ 0.07
Visfatina/Nampt (100 ng/kg/día; n=82, r=31)	5.74 $\pm$ 0.20	94.44 $\pm$ 2.14	6.95 $\pm$ 0.09*
FK866 (2.4 mg/kg/día; n=15, r=4)	6.00 $\pm$ 0.61	93.35 $\pm$ 4.04	7.70 $\pm$ 0.11
CLI-095 (3 mg/kg/día; n=18, r=4)	6.35 $\pm$ 0.38	96.72 $\pm$ 4.31	7.49 $\pm$ 0.13
MCC950 (10 mg/kg; n=17, r=4)	4.87 $\pm$ 0.36	99.69 $\pm$ 4.10	8.18 $\pm$ 0.19
Anakinra (100 mg/kg; n=23, r=8)	6.49 $\pm$ 0.58	103.92 $\pm$ 4.60	7.99 $\pm$ 0.14
Visfatina/Nampt + FK866 (n=15, r=4)	5.71 $\pm$ 0.39	93.27 $\pm$ 5.60	7.51 $\pm$ 0.09+
Visfatina/Nampt + CLI-095 (n=18, r=4)	6.25 $\pm$ 0.47	104.93 $\pm$ 4.96	7.91 $\pm$ 0.21+
Visfatina/Nampt + MCC950 (n=19, r=4)	5.72 $\pm$ 0.60	86.13 $\pm$ 8.48	7.87 $\pm$ 0.12+
Visfatina/Nampt + Anakinra (n=15, r=4)	5.83 $\pm$ 0.65	89.58 $\pm$ 6.20	7.94 $\pm$ 0.22+
IL-1 $\beta$ (12 $\mu$ g/kg/día; n=17, r=4)	5.61 $\pm$ 0.66	98.16 $\pm$ 6,44	7.14 $\pm$ 0.11*
IL-1 $\beta$ + Anakinra (n=15, r=4)	4.48 $\pm$ 0.41	84.26 $\pm$ 3.83	7.63 $\pm$ 0.11#



Tabla 9. Continuación

Tratamientos	Respuesta a NA (mN)	%NA con respecto a K <sup>+</sup>	pEC <sub>50</sub> para SNP
Salino (100 µL/día; n=24, r=17)	4.82 ± 0.43	102.26 ± 8.54	6.94 ± 0.17
Visfatina/Nampt (100 ng/kg/día; n=29, r=15)	5.73 ± 0.44	109.57 ± 7.39	6.95 ± 0.15
FK866 (2.4 mg/kg/día; n=3, r=3)	6.98 ± 1.34	97.99 ± 14.87	6.73 ± 0.09
CLI-095 (3 mg/kg/día; n=9, r=4)	6.61 ± 1.02	106.59 ± 4.06	6.60 ± 0.29
MCC950 (10 mg/kg/día; n=11, r=4)	5.04 ± 0.56	91.04 ± 4.35	8.00 ± 0.13
Anakinra (100 mg/kg/día; n=15, r=8)	5.00 ± 0.53	97.93 ± 6.46	6.83 ± 0.20
Visfatina/Nampt + FK866 (n=9, r=5)	4.69 ± 0.58	104.11 ± 6.97	6.69 ± 0.20
Visfatina/Nampt + CLI-095 (n=9, r=4)	6.26 ± 0.56	101.71 ± 7.88	6.71 ± 0.27
Visfatina/Nampt + MCC950 (n=10, r=4)	5.85 ± 0.85	90.37 ± 5.93	7.65 ± 0.17
Visfatina/Nampt + Anakinra (n=5, r=3)	4.58 ± 0.84	109.66 ± 15.44	6.62 ± 0.39
IL-1β (12 µg/kg/día; n=9, r=4)	4.15 ± 0.41	86.11 ± 5.79	6.95 ± 0.15
IL-1β + Anakinra (n=7, r=4)	4.32 ± 0.60	88.36 ± 6.63	6.73 ± 0.31

## V DISCUSIÓN

Actualmente existe un debate abierto sobre el papel fisiopatológico de la visfatina/Nampt en distintas enfermedades cardíacas y renales. Como se ha descrito anteriormente, la visfatina/Nampt es una proteína pleiotrópica que puede actuar como adipoquina, enzima o factor de crecimiento (Carbone et al., 2017). No se conocen con exactitud las diferencias entre la estructura molecular de iNampt y eNampt, las isoformas intra- y extracelulares, respectivamente (Carbone et al., 2017), pero la eNampt circulante o visfatina/Nampt ha sido detectada en pacientes con un rango entre 10-282 ng/mL (Chan et al., 2007; Sandeep et al., 2007), que se correlaciona positivamente con alteraciones metabólicas, como DMT2 o el síndrome metabólico y renales (Chen et al, 2006; Filippatos et al, 2008; Yilmaz et al., 2008; Hajjafar et al., 2012).

La disfunción endotelial es un fenómeno que ocurre tempranamente en muchas enfermedades vasculares, incluyendo la aterosclerosis, y ha sido descrita en pacientes con patologías cardiometabólicas, renales o con niveles plasmáticos elevados de visfatina/Nampt (Takebayashi et al, 2007; Yilmaz et al, 2008). Es interesante que en pacientes con DMT2 también se ha observado la asociación entre los niveles plasmáticos altos de visfatina/Nampt y la disfunción endotelial, medida por pletismografía del antebrazo (Takebayashi et al, 2007). Asimismo, la visfatina/Nampt plasmática está incrementada en pacientes ateroscleróticos con enfermedad coronaria (Liu et al, 2009) y en paciente con DMT2 con aterosclerosis carotídea (Kadoglou et al, 2010). También se ha descrito la asociación entre visfatina/Nampt sérica con la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad renal crónica, en este caso medida con ultrasonidos de alta resolución (Yilmaz et al, 2008).

Por otro lado, diversos investigadores, incluyendo nuestro grupo, han propuesto que la visfatina/Nampt no sólo es un biomarcador sino que también induce las alteraciones cardiovasculares y renales ligadas a la obesidad y DMT2 (Filippatos et al, 2010; Peiró et al, 2010; Romacho et al, 2013a; Briffa et al, 2013). Datos más recientes confirman esta propuesta, proporcionando evidencia adicional sobre las conexiones entre la visfatina/Nampt plasmática y las enfermedades cardiovasculares (Hung et al, 2015; Liakos et al, 2016), especialmente cuando estas patologías son concomitantes con enfermedad renal crónica (Lu et al, 2013; Hsu et al, 2015; El-Shistawy et al, 2016). Además, hay un punto en común en los distintos ensayos clínicos que enlazan la visfatina/Nampt con las enfermedades cardiovasculares y renales: la relación clara que existe entre esta adipoquina y la inflamación (Kocelak et al, 2015; Grzywocz et al, 2016; Kacso et al, 2016). En este sentido, la visfatina/Nampt es considerada un buen marcador renal de inflamación en otras situaciones clínicas, como son los pacientes que reciben un trasplante renal (Malyszco et al, 2009; Nagy et al, 2016).

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado la capacidad de visfatina/Nampt para inducir la activación del factor de transcripción pro-inflamatorio NF- $\kappa$ B en cultivos de músculo liso vascular humano, para lo que se requiere la síntesis de NMN a través de su actividad enzimática Nampt (Romacho et al, 2009). Asimismo, nuestro grupo ha demostrado que la visfatina/Nampt, también mediante la producción de NMN, induce disfunción endotelial cuando se administra *ex vivo* en microvasos mesentéricos aislados de rata u obtenidos de pacientes (Vallejo et al, 2011).

Además, ambos compuestos, visfatina/Nampt y NMN, estimulan la actividad NADPH oxidasa y la secreción de aniones superóxido en cultivos de HUVEC (Vallejo et al, 2011).

En el presente trabajo hemos confirmado la capacidad de este compuesto para producir *ex vivo* una alteración similar de la función endotelial en microvasos mesentéricos aislados de ratón, así como de inducir en cultivos de HUVEC la activación de NF- $\kappa$ B, medida en este caso como el aumento de la proteína fosforilada p-p65. También de acuerdo con nuestros trabajos previos (Romacho et al, 2009; Vallejo et al, 2011), los efectos pro-inflamatorios y la disfunción endotelial producidos por visfatina/Nampt están mediados por la síntesis enzimática de NMN, ya que se reducen en presencia del inhibidor de esta enzima (FK866) y se mimetizan por NMN exógena.

La disfunción endotelial evocada por visfatina/Nampt en vasos murinos está mediada por la liberación de anión superóxido, debido al aumento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, lo que puede ser bloqueado por apocinina, de modo análogo a lo observado previamente (Vallejo et al, 2011). En este sentido, se ha propuesto una posible retroalimentación positiva entre ROS, mediante la activación de Nox, y la activación de NF- $\kappa$ B, que podría promover una respuesta inflamatoria sostenida con secreción de citoquinas y muerte celular (Dauphinee & Karsan, 2006; Becerra et al., 2011; Sarmiento et al., 2014).

Nuestros datos también indican que la disfunción endotelial está mediada por la activación de receptores TLR4, ya que su antagonista CLI-095 revierte la disminución de la relajación-dependiente de endotelio inducida tanto por visfatina/Nampt como por NMN. Se sabe que la activación de TLR4 en células endoteliales desencadena una serie de señales intracelulares que producen la activación de Nox y su consecuente producción de ROS, así como la activación de NF- $\kappa$ B (Sarmiento et al., 2014). En el presente trabajo en HUVEC cultivadas, se observó una activación de NF- $\kappa$ B inducida por visfatina/Nampt y NMN, expresada como incremento de p-p65, posiblemente relacionada con el estrés oxidativo, y que tendía a reducirse tras el bloqueo de los receptores TLR4 con CLI-095.

Se ha propuesto que los receptores TLR4 se expresan en las células del sistema cardiovascular y su activación está implicada en patologías inflamatorias de la pared vascular, incluyendo aterosclerosis, diabetes o síndrome metabólico (Wijnand et al., 2010; Jialal et al., 2014). La participación de TLR4 en los mecanismos inflamatorios inducidos por visfatina/Nampt se ha sugerido en células endoteliales de pulmón humanas y de ratón (Camp et al, 2015), aunque estos autores no relacionan la activación de TLR4 con la síntesis de NMN, sino que proponen una interacción directa entre el receptor TLR4 y una región saliente de la molécula de visfatina/Nampt que tiene semejanza estructural con el LPS (Camp et al, 2015). Por otro lado, se ha descrito que la activación de TLR4 puede favorecer la secreción de eNampt hacia el espacio extracelular (Ognjanovic et al., 2005; Pillai et al., 2012; Kovacs et al., 2016) y activar vías pro-inflamatorias como STAT3, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, para producir citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Hassan et al., 2006; Bauer et al., 2012; Magnone et al., 2012),

La disfunción endotelial observada en el presente estudio se revirtió asimismo mediante el bloqueo de los receptores para tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) con SQ 29.546, lo que sugiere la

participación de prostanoideos vasoconstrictores en la misma, lo que también se ha propuesto en otros modelos de disfunción endotelial (Alfranca et al., 2006; Sun et al., 2017). En este sentido, se ha descrito que la visfatina/Nampt aumenta la expresión de tromboxano sintetasa y de la biosíntesis de TXA<sub>2</sub> en células endoteliales microvasculares humanas, facilitando la expresión de la expresión de IL-8 y la angiogénesis (Kim et al, 2012). También se ha sugerido en macrófagos murinos un papel para la COX-2 como regulador de la producción de IL-1 $\beta$  derivada del inflamasoma NLRP3 (Hua et al, 2015).

Los inflamasomas son estructuras de señalización especializadas que resultan cruciales en la regulación de las respuesta inmune e inflamatoria (Choi & Ryter, 2014; Lamkanfi & Dixit, 2014). Entre ellos, la familia del inflamasoma NLRP3 incluye una primera señal iniciadora mediante una activación de NF- $\kappa$ B dependiente de TLR4, que conduce a la transcripción de NLRP3 y a la pro-forma de la citoquina inflamatoria IL-1 $\beta$ ; en un segundo paso, se activa la caspasa-1, lo que facilita el paso de la pro-IL-1 $\beta$  formada a IL-1 $\beta$  madura (Choi & Ryter, 2014; Lamkanfi & Dixit, 2014). Desde luego, existe una importante regulación redox para el inflamasoma NLRP3, ya que los aniones superóxido son mediadores cruciales en la vía señalizadora dependiente de NF- $\kappa$ B (Haneklaus et al, 2013; Abais et al, 2015).

En nuestros experimentos con HUVEC cultivadas, la visfatina/Nampt induce el inflamasoma NLRP3 de acuerdo con su posible interacción con TLR4 mediante la síntesis de NMN, así como por sus efectos sobre la activación de NF- $\kappa$ B. Más aún, la visfatina/Nampt parece activar la entera vía canónica del inflamasoma, lo que incrementa la expresión de pro-IL-1 $\beta$  e IL-1 $\beta$ , siendo estos efectos también sensibles al bloqueo de la actividad enzimática Nampt o de los receptores TLR4. Aunque la inducción del inflamasoma por la visfatina/Nampt ha sido descrita en células endoteliales de ratón, los mecanismos propuestos no están en relación con TLR4, sino con aniones superóxidos derivados de vesículas de membrana (Xia et al, 2014) o receptores del tipo de los RAGEs (Chen et al, 2015).

Sobre la base de los experimentos realizados *ex vivo* en microvasos mesentéricos aislados, así como en los datos obtenidos en HUVEC, se diseñó un modelo experimental para determinar el efecto de la infusión de visfatina/Nampt *in vivo* durante siete días en ratones previamente sanos. La hipótesis proponía que, en ausencia de cualquier otra situación fisiopatológica, la infusión de visfatina/Nampt podía inducir directamente disfunción endotelial e inflamación vascular. Conforme a esta propuesta, cuando los microvasos mesentéricos se aislaron de los ratones tratados con visfatina/Nampt y su reactividad vascular se estudió en un miógrafo, se observó una significativa disfunción endotelial. Además, la alteración de las relajaciones dependientes de endotelio se bloqueó por la infusión simultánea de FK866 o la administración intraperitoneal de CLI-095, lo que sugiere que la disfunción endotelial en estas condiciones, análogamente a lo ocurrido *ex vivo* en reactividad vascular y a los datos obtenidos *in vitro* en HUVEC, está probablemente mediada por NMN, el producto final de la actividad enzimática Nampt, y es dependiente de TLR4; mientras que el papel de la enzima Nox se comprobó determinando su sensibilidad a apocinina y la participación de TXA<sub>2</sub> se determinó al antagonizar su receptor TP con SQ 29,548.

En desacuerdo con este abordaje experimental, se ha propuesto que la visfatina/Nampt no es capaz de catalizar la formación de NMN en el espacio extracelular debido a los bajos niveles del sustrato 5-fosforribosil-1-pirofosfato PRPP y de ATP, activadores principales de la actividad enzimática Nampt (Hara et al., 2011). Sin embargo, otros trabajos han podido medir una actividad enzimática eNampt significativa (Ognjanovic y Bryant-Greenwood, 2002; Revollo et al., 2007; Garten et al. 2010; Friebe et al., 2011; Zamporlini et al., 2014), así como la detección de su producto, NMN, en el espacio extracelular (Revollo et al., 2007; Formentini et al., 2009; Garavaglia et al., 2012). También se ha propuesto que, en condiciones patológicas como muerte celular, inflamación, necrosis, apoptosis e isquemia, los niveles de PRPP y ATP pueden aumentar en el espacio extracelular, lo que podría favorecer la actividad enzimática de eNampt (Garten et al., 2015).

Tras la infusión *in vivo* de visfatina/Nampt durante siete días, se detectó un incremento de los parámetros inflamatorios vasculares. En efecto, en homogenados de la pared vascular aórtica obtenida de estos animales se observó un aumento de la expresión de p-p65, que indica activación de NF- $\kappa$ B, así como de la enzima pro-inflamatoria iNOS; además, también se incrementó la expresión del NLRP3, lo que indica el ensamblaje del inflammasoma en estas condiciones experimentales. En base a ello, analizamos la posibilidad de que en la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt participen al menos dos procesos, que se activan de forma secuencial.

En primer lugar, a través de la actividad enzimática Nampt y la síntesis de NMN, la visfatina/Nampt activa los receptores TLR4, lo que desencadena un mecanismo relacionado con la secreción de aniones superóxido por la enzima NADPH oxidasa y la producción de prostanoïdes vasoconstrictores. Esto se deduce de los resultados obtenidos cuando la visfatina/Nampt se administra *ex vivo*, tanto en este trabajo como en estudios anteriores (Vallejo et al, 2011).

Sin embargo, nuestros datos actuales, mediante la infusión de visfatina/Nampt en ratones C57BL/6, proporcionan evidencia experimental que apoya la existencia de una segunda vía de desarrollo más tardío, y posiblemente más sostenida, que parece estar ligada a la activación del inflammasoma NLRP3. En efecto, un inhibidor específico del ensamblaje del inflammasoma NLRP3 como MCC950 (Coll et al, 2015), que es capaz de bloquear la expresión de NLRP3 o pro-IL-1 $\beta$  en cultivos de HUVEC, previene la disfunción endotelial inducida por el tratamiento *in vivo* de visfatina/Nampt. En contraste, la alteración de la función endotelial producida por la incubación *ex vivo* con la adipoquina no se modifica, lo que se explica por la falta de activación del inflammasoma, dado el corto periodo de incubación con visfatina/Nampt en estas condiciones experimentales (30 min).

La posible participación del inflammasoma NLRP3 en el daño vascular inducido por visfatina/Nampt ha sido descrito por otros autores, aunque relacionada con un incremento en la formación de la neointima (Xia et al, 2014) o una disrupción de las uniones inter-endoteliales (Chen et al, 2015). En contraste, nuestros resultados indican un proceso similar al descrito para las células del sistema inmune, en las que la activación de TLR4 promueve el incremento de

citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18, que se inicia mediante la cascada de señalización NF- $\kappa$ B, prosigue con el consecuente ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y finaliza con la síntesis y liberación las formas maduras de IL-1 $\beta$  y de IL-18 (Man y Kanneganti et al., 2015; Tan et al., 2017; Su et al., 2018). Por tanto, el efector último de la disfunción endotelial inducida por visfatina/Nampt debiera ser la IL-1 $\beta$ , ya que esta citoquina es el producto final secretado por la activación de dicha maquinaria pro-inflamatoria.

Confirmando esta hipótesis, el antagonista recombinante de los receptores a IL-1, anakinra, antagonizó la disfunción endotelial evocada por visfatina/Nampt sólo cuando esta adipocina era infundida *in vivo* durante un periodo de siete días. De manera análoga a lo ocurrido con MCC950, proponemos que la sensibilidad a anakinra refleja la plena activación del inflamasoma NLRP3 por visfatina/Nampt, incluyendo la secreción final de IL-1 $\beta$ , que requiere un cierto tiempo para ser sintetizada y liberada, y que es por tanto el efector último de la disfunción endotelial en estas condiciones experimentales. Por el contrario, la alteración de las relajaciones-dependientes de endotelio que ocurre de forma temprana por la administración *ex vivo* de visfatina/Nampt, que se debe esencialmente a los aniones superóxido producidos por la actividad NADPH oxidasa y/o a prostanoïdes vasoconstrictores, no se modificó por anakinra, indicando la falta de activación del inflamasoma NLRP3 y, lógicamente, la ausencia de disfunción endotelial mediada por IL-1 $\beta$  que pudiera ser antagonizada por el antagonista.

Nuestro laboratorio ha demostrado previamente la capacidad de la IL-1 $\beta$  exógena para producir disfunción endotelial en ratas a través de un mecanismo que implica los receptores IL-1 y la producción de aniones superóxido por la enzima NADPH oxidasa (Vallejo et al, 2014) y que confirma lo descrito asimismo por otros autores (Dinarello, 1996; Strijdom et al., 2009; Palomo et al., 2015). En el presente trabajo hemos obtenido resultados análogos en microvasos de ratón con IL-1 $\beta$ , tanto mediante su incubación *ex vivo* como mediante su administración *in vivo* durante siete días. En todos los casos, la disfunción endotelial inducida por esta citoquina se antagonizó con anakinra, lo que apoya asimismo nuestra hipótesis. También se ha descrito que anakinra puede mejorar la disfunción endotelial en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina aunque, de manera interesante, los niveles circulantes de citoquina pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , no están aumentados en estos animales, indicando un secreción paracrina de IL-1 $\beta$  en el tejido vascular (Vallejo et al, 2014), que es compatible con una activación selectiva del inflamasoma NLRP3 en algunos tejidos. Además, la IL-1 $\beta$  producida localmente puede originar una secreción adicional de visfatina/Nampt desde las células endoteliales (Romacho et al, 2013b).

Hay trabajos que sugieren un papel para la activación de NLRP3 en enfermedades metabólicas como obesidad y DMT2, especialmente en aspectos relacionados con la disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas y la inflamación del tejido adiposo (Choi & Ryter, 2014; Haneklaus & O'Neill, 2015), aunque también se ha propuesto el papel del inflamasoma en la cardiomiopatía diabética (Luo et al, 2014). Como se ha indicado anteriormente, la disfunción endotelial es un evento inicial de la vasculopatía diabética o inducida por la obesidad. Por ello, nuestros datos sugieren que las células endoteliales pueden ser una interfaz temprana para la interacción con

adipoquinas, como visfatina/Nampt, capaces de producir inflamación de la pared vascular. Además, estos resultados apoyan los abordajes terapéuticos basados en los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la inflamación. Si el inflamasoma NLRP3 y la IL-1 $\beta$  tisular constituyen los principales efectores finales del daño vascular inducido por las adipoquinas, los inhibidores selectivos como MCC950 resultan alternativas terapéuticas interesantes que se han demostrado efectivas en algunos modelos experimentales de patología cardiovascular (Van Hout et al, 2016; Van der Heijden et al, 2017).

Por otra parte, el bloqueo de los receptores para IL-1 es asimismo un abordaje evidente para antagonizar los efectos inflamatorios vasculares que pueden ser desencadenados por muchos estímulos diferentes que convergen en la activación del inflamasoma NLRP3. En efecto, esta puede ser una buena explicación de porqué los antagonistas de los receptores para IL-1 producen importantes beneficios en modelos humanos y experimentales de enfermedades cardiometabólicas, al reducir el ambiente pro-inflamatorio vascular y sistémico (Larsen et al, 2007; Qamar & Rader, 2012; Vallejo et al, 2014; Peiró et al, 2017). Algo parecido puede ocurrir con canakinumab, un anticuerpo monoclonal humanizado frente a IL- $\beta$  (Church & McDermott, 2009), que ha sido administrado en un ensayo clínico recientemente publicado a 10.061 pacientes con infarto de miocardio previo y niveles elevado de proteína C reactiva de alta sensibilidad (Ridker et al, 2017). Los resultados de este ensayo han sido muy importantes; tras cuatro años de tratamiento con canakinumab en esta población de alto riesgo, se ha registrado un descenso significativo de los eventos cardiovasculares, independientemente de la bajada de lípidos plasmáticos (Ridker et al, 2017), que se correlaciona con la disminución en plasma de la proteína C de alta sensibilidad, es decir, con el nivel de inflamación (Ridker et al, 2018a). Es interesante destacar que, aunque los pacientes de la población estudiada con diabetes mellitus o enfermedad renal crónica se benefician con el tratamiento con canakinumab y presentan asimismo menos eventos cardiovasculares, la evolución de sus respectiva patología metabólica o renal no se modifica (Everett et al, 2018; Ridker et al, 2018b), lo que sugiere un efecto selectivo de este fármaco sobre la inflamación vascular.

En conclusión, la infusión de visfatina/Nampt produce disfunción endotelial *in vivo*, corroborando su posible papel como mediador del daño vascular asociado a enfermedades cardiometabólicas descrito anteriormente. Además, esta adipoquina parece tener varios mecanismos celulares y moleculares involucrados, incluyendo su actividad enzimática Nampt y la activación del receptor TLR4 mediante la síntesis de NMN, su producto enzimático. Asimismo, se activan vías inflamatorias, como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y la secreción de la forma madura de IL-1 $\beta$  de forma paracrina. Es interesante que el daño vascular producido por visfatina/Nampt se previene con CLI-095 y anakinra. Por lo tanto, dianas como los receptores del tipo TLR4 o IL-1 son dianas terapéuticas estratégicas para prevenir las complicaciones vasculares de las enfermedades cardiometabólicas.



## **VI CONCLUSIONES**

1. La administración de visfatina/Nampt, tanto *ex vivo* como *in vivo*, produce un deterioro de las relajaciones vasculares dependientes de endotelio en microvasos mesentéricos de ratón C57BL/6, a través de su actividad enzimática Nampt y la síntesis de NMN.
2. El tratamiento de las células endoteliales cultivadas con visfatina/Nampt induce la activación de NF- $\kappa$ B, el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, así como la expresión de pro-IL-1 $\beta$ .
3. Los efectos pro-inflamatorios y la disfunción endotelial inducidos por visfatina/Nampt se producen mediante la activación del receptor TLR4.
4. La infusión de visfatina/Nampt durante siete días en ratones C57BL/6 produce inflamación de la pared aórtica, aumentando la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la expresión del inflamasoma NLRP3.
5. La disfunción endotelial producida por la administración *ex vivo* de visfatina/Nampt durante 30 minutos está mediada por el aumento del estrés oxidativo y la producción de prostanoïdes vasoconstrictores.
6. La disfunción endotelial producida por la administración *in vivo* de visfatina/Nampt durante siete días está mediada por la activación del inflamasoma y la secreción tisular paracrina de IL-1 $\beta$ , ya que inhibe por el bloqueo de los receptores para IL-1 con anakinra que, por el contrario, no modifica las acciones *ex vivo* de la adipocina.
7. Los receptores del tipo TLR4 o IL-1 pueden ser dianas terapéuticas estratégicas para prevenir las complicaciones vasculares de las enfermedades cardiometabólicas.

### **Conclusión final**

La infusión de visfatina/Nampt produce disfunción endotelial *in vivo*, corroborando su posible papel como mediador del daño vascular asociado a enfermedades cardiometabólicas descrito anteriormente. Además, esta adipocina parece tener varios mecanismos celulares y moleculares involucrados, incluyendo su actividad enzimática Nampt y la activación del receptor TLR4 mediante la síntesis de NMN, su producto enzimático. Asimismo, se activan vías inflamatorias, como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y la secreción de la forma madura de IL-1 $\beta$  de forma paracrina. Es interesante que el daño vascular producido por visfatina/Nampt se previene con CLI-095 y anakinra. Por lo tanto, dianas como los receptores del tipo TLR4 o IL-1 son dianas terapéuticas estratégicas para prevenir las complicaciones vasculares de las enfermedades cardiometabólicas.

## **VII      REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abais, J. M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K. M., & Li, P. L. (2015). Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?. *Antioxidants & redox signaling*, 22(13), 1111-1129.
2. Abbate, A., Salloum, F. N., Vecile, E., Das, A., Hoke, N. N., Straino, S., Biondi-Zoccai, G. L.; Houser J. E.; Qureshi, I. Z.; Ownby E. D.; Gustini, E.; Biasucci, L. M.; Severino, A.; Capogrossi M. C.; Vetrovec G. W.; Crea F.; Baldi, A.; Kukreja R.; Dobrina A. (2008). Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*, 117(20), 2670-2683.
3. Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T., & Rouis, M. (2015). NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox biology*, 4, 296-307.
4. Addabbo, F., Montagnani, M., & Goligorsky, M. S. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53(6), 885-892.
5. Adeghate, E. (2008). Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Current medicinal chemistry*, 15(18), 1851-1862.
6. Adya, R., Tan, B. K., Chen, J., & Randeve, H. S. (2009). Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF)/visfatin induces secretion of MCP-1 in human endothelial cells: role in visfatin-induced angiogenesis. *Atherosclerosis*, 205(1), 113-119.
7. Adya, R., Tan, B. K., Pun, A., Chen, J., & Randeve, H. S. (2007). Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovascular research*, 78(2), 356-365.
8. Ajuwon, K. M., & Spurlock, M. E. (2005). Adiponectin inhibits LPS-induced NF-κB activation and IL-6 production and increases PPARγ2 expression in adipocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(5), R1220-R1225.
9. Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 4(7), 499.
10. Aldieri, E., Riganti, C., Polimeni, M., Gazzano, E., Lussiana, C., Campia, I., & Ghigo, D. (2008). Classical inhibitors of NOX NAD (P) H oxidases are not specific. *Current drug metabolism*, 9(8), 686-696.
11. Alexandraki, K., Piperi, C., Kalofoutis, C., Singh, J., Alaveras, A., & Kalofoutis, A. (2006). Inflammatory process in type 2 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1084(1), 89-117.
12. Alfranca, A., Iñiguez, M. A., Fresno, M., & Redondo, J. M. (2006). Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research*, 70(3), 446-456.
13. Altenhöfer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W., Wingler, K., & Schmidt, H. H. (2015). Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxidants & redox signaling*, 23(5), 406-427.
14. Anderson, P. D., Mehta, N. N., Wolfe, M. L., Hinkle, C. C., Pruscino, L., Comiskey, L. L., Tabita-Martinez, J., Sellers, K.F., Rickels, M. R. & Reilly, M. P. (2007). Innate immunity modulates adipokines in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(6), 2272-2279.
15. Arnush, M., Heitmeier, M. R., Scarim, A. L., Marino, M. H., Manning, P. T., & Corbett, J. A. (1998). IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *The Journal of clinical investigation*, 102(3), 516-526.
16. Avogaro, A., de Kreutzenberg, S. V., & Fadini, G. (2008). Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 82, S94-S101.
17. Azcutia, V., Abu-Taha, M., Romacho, T., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Luscinskas, F. W., Rodríguez-MañáscL., Sanz M. J., Sánchez-Ferrer, C. F. & Peiró, C. (2010). Inflammation determines the pro-adhesive properties of high extracellular d-glucose in human endothelial cells in vitro and rat microvessels in vivo. *PLoS One*, 5(4), e10091.
18. Bae, Y. H., Bae, M. K., Kim, S. R., Lee, J. H., Wee, H. J., & Bae, S. K. (2009). Upregulation of fibroblast growth factor-2 by visfatin that promotes endothelial angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(2), 206-211.

19. Ballak, D. B., Stienstra, R., Tack, C. J., Dinarello, C. A., & van Diepen, J. A. (2015). IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*, 75(2), 280-290.
20. Ballinger, S. W., Patterson, C., Knight-Lozano, C. A., Burow, D. L., Conklin, C. A., Hu, Z., Reuf, J., Horaist, C., Lebovitz, R., Hunter, G.C., McIntyre, K. & Runge, M.S (2002). Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*, 106(5), 544-549.
21. Bauer, I., Grozio, A., Lasigliè, D., Basile, G., Sturla, L., Magnone, M., Sociali, G., Soncini, D., Caffa, I., Poggi, A., Zoppoli, G., Cea, M., Feldmann, G., Mostoslavsky, R., Ballestrero, A., Patrone, F., Bruzzone, S. & Nencioni, A. (2012). The NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> responses. *Journal of Biological Chemistry*, 287(49), 40924-40937.
22. Becerra, A., Echeverría, C., Varela, D., Sarmiento, D., Armisén, R., Nuñez-Villena, F., Montecinos, F. & Simon, F. (2011). Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death. *Cardiovascular research*, 91(4), 677-684.
23. Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245-313.
24. Bekhbat, M., Rowson, S. A., & Neigh, G. N. (2017). Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFκB in good times and bad. *Frontiers in neuroendocrinology*, 46, 15-31.
25. Belenky, P., Bogan, K. L., & Brenner, C. (2007). NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 12-19.
26. Benedict, C., Shostak, A., Lange, T., Brooks, S. J., Schiöth, H. B., Schultes, B., Born, J.; Oster, H.; & Hallschmid, M. (2012). Diurnal rhythm of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt/visfatin/PBEF): impact of sleep loss and relation to glucose metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(2), E218-E222.
27. Berda-Haddad, Y., Robert, S., Salers, P., Zekraoui, L., Farnarier, C., Dinarello, C. A., Dignat-George, F.; & Kaplanski, G. (2011). Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1α. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20684-20689.
28. Bi, T. Q., & Che, X. M. (2010). Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer biology & therapy*, 10(2), 119-125.
29. Blakemore, A. I., Meyre, D., Delplanque, J., Vatin, V., Lecoœur, C., Marre, M., Tichet, J., Balkau, B., Froguel, P. & Walley, A. J. (2009). A rare variant in the visfatin gene (NAMPT/PBEF1) is associated with protection from obesity. *Obesity*, 17(8), 1549-1553.
30. Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., Lackner, K. J & AstheroGene Investigators. (2004). Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Obstetrical & gynecological survey*, 59(4), 268-269.
31. Blüher, M. (2014). Adipokines—removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Molecular metabolism*, 3(3), 230-240.
32. Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46(1), 3-10.
33. Briffa, J. F., McAinch, A. J., Poronnik, P., & Hryciw, D. H. (2013). Adipokines as a link between obesity and chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 305(12), F1629-F1636.
34. Brown, J. D., Lin, C. Y., Duan, Q., Griffin, G., Federation, A. J., Paranal, R. M., Bair S., Newton, G., Lichtman, A., Kung, A., Yang, T., Wang, H., Lusinskas, F.W., Croce, K., Bradner, J. E. & Yang, T. (2014). NF-κB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Molecular cell*, 56(2), 219-231.
35. Bruzzone, S., Fruscione, F., Morando, S., Ferrando, T., Poggi, A., Garuti, A., D'Urso, A., Selmo, M., Benvenuto, F., Cea, M., Zoppoli, G., Moran, E., Soncini, D., Ballestrero, A., Sordat, B., Patrone, F., Mostoslavsky, R., Uccelli, A., & Nencioni, A. (2009). Catastrophic NAD<sup>+</sup> depletion in activated T lymphocytes through Nampt inhibition reduces demyelination and disability in EAE. *PloS one*, 4(11), e7897.
36. Bryan, N. S., Bian, K., & Murad, F. (2009). Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci*, 14(1), 1-18.

37. Bulcão, C., Ferreira, S. R., Giuffrida, F., & Ribeiro-Filho, F. F. (2006). The new adipose tissue and adipocytokines. *Current diabetes reviews*, 2(1), 19-28.
38. Burgos, E. S., Veticatt, M. J., & Schramm, V. L. (2013). Recycling nicotinamide. The transition-state structure of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Journal of the American Chemical Society*, 135(9), 3485-3493.
39. Burgos, E.S. (2011). NAMPT in regulated NAD biosynthesis and its pivotal role in human metabolism. *Current medicinal chemistry*, 18(13), 1947-1961.
40. Burtenshaw, D., Hakimjavadi, R., Redmond, E. M., & Cahill, P. A. (2017). Nox, reactive oxygen species and regulation of vascular cell fate. *Antioxidants*, 6(4), 90.
41. Cade, W. T. (2008). Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Physical therapy*, 88(11), 1322-1335.
42. Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*, 87(10), 840-844.
43. Camp, S. M., Ceco, E., Evenoski, C. L., Danilov, S. M., Zhou, T., Chiang, E. T., Moreno-Vinasco, L., Mapes, B., Zhao, J., GURSOY, G., Brown, M. E., Adyshev, D. M., Siddiqui, S. S., Quijada, H., Sammani, S., Letsiou, E., Saadat, L., Yousef, M., Wang, T., Liang, J. & Garcia J.G. (2015). Unique toll-like receptor 4 activation by NAMPT/PBEF induces NFκB signaling and inflammatory lung injury. *Scientific reports*, 5, 13135.
44. Carbone, F., Liberale, L., Bonaventura, A., Vecchiè, A., Casula, M., Cea, M., Monacelli, F., Caffa, I., Bruzzone, S., Montecucco, F., & Nencioni, A. (2017). Regulation and function of extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin. *Compr Physiol*, 7, 603-21.
45. Carda, A. P., Marchi, K. C., Rizzi, E., Mecawi, A. S., Antunes-Rodrigues, J., Padovan, C. M., & Tirapelli, C. R. (2015). Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. *Stress*, 18(2), 233-243.
46. Carpenter, S., & O'Neill, L. A. (2009). Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochemical Journal*, 422(1), 1-10.
47. Carrillo-Sepulveda, M. A., Spitler, K., Pandey, D., Berkowitz, D. E., & Matsumoto, T. (2015). Inhibition of TLR4 attenuates vascular dysfunction and oxidative stress in diabetic rats. *Journal of Molecular Medicine*, 93(12), 1341-1354.
48. Chamberlain, J., Evans, D., King, A., Dewberry, R., Dower, S., Crossman, D., & Francis, S. (2006). Interleukin-1β and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells modulates the extent of neointima formation in mice. *The American journal of pathology*, 168(4), 1396-1403.
49. Chan, T. F., Chen, Y. L., Chen, H. H., Lee, C. H., Jong, S. B., & Tsai, E. M. (2007). Increased plasma visfatin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 88(2), 401-405.
50. Chang, L., Yang, R., Wang, M., Liu, J., Wang, Y., Zhang, H., & Li, Y. (2012). Angiotensin II type-1 receptor-JAK/STAT pathway mediates the induction of visfatin in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The American journal of the medical sciences*, 343(3), 220-226.
51. Chang, Y. H., Chang, D. M., Lin, K. C., Shin, S. J., & Lee, Y. J. (2011). Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 27(6), 515-527.
52. Chen, J. Y., Ye, Z. X., Wang, X. F., Chang, J., Yang, M. W., Zhong, H. H., Hong, F. F. & Yang, S. L. (2018). Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 423-428.
53. Chen, M. P., Chung, F. M., Chang, D. M., Tsai, J. C. R., Huang, H. F., Shin, S. J., & Lee, Y. J. (2006). Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(1), 295-299.
54. Chen, Q., Parker, W. C., Devine, I., Ondraskik, R., Habtamu, T., Bartol, K., Casey, B., Patel, H., Chau, W., Kuhn, T., Barsotti, R., & Young, L. (2016). Apocynin Exerts Dose-Dependent Cardioprotective Effects by Attenuating Reactive Oxygen Species in Ischemia/Reperfusion. *Cardiovascular Pharmacology*, 5(2).
55. Chen, Y., Chen, M., Wu, Z., & Zhao, S. (2013). Ox-LDL induces ER stress and promotes the adipokines secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Plos one*, 8(10), e81379.

56. Chen, Y., Liang, Y., Hu, T., Wei, R., Cai, C., Wang, P., Wang, L., Qiao, W. & Feng, L. (2017). Endogenous Nampt upregulation is associated with diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis through the NF- $\kappa$ B p65 and Sirt1 pathway; NMN alleviates diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis by inhibiting endogenous Nampt. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(5), 4181-4193.
57. Chen, Y., Pitzer, A. L., Li, X., Li, P. L., Wang, L., & Zhang, Y. (2015). Instigation of endothelial Nlrp3 inflammasome by adipokine visfatin promotes inter-endothelial junction disruption: role of HMGB 1. *Journal of cellular and molecular medicine*, 19(12), 2715-2727.
58. Cheng, F., Torzewski, M., Degreif, A., Rossmann, H., Canisius, A., & Lackner, K. J. (2013). Impact of glutathione peroxidase-1 deficiency on macrophage foam cell formation and proliferation: implications for atherogenesis. *PLoS one*, 8(8), e72063.
59. Chhabra, N. (2009). Endothelial dysfunction-A predictor of atherosclerosis. *Internet Journal of Medical Update*, 4(1).
60. Chi, H., Messas, E., Levine, R. A., Graves, D. T., & Amar, S. (2004). Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation*, 110(12), 1678-1685.
61. Chiarugi, A., Dölle, C., Felici, R., & Ziegler, M. (2012). The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer*, 12(11), 741.
62. Chiu, J. J., & Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological reviews*, 91(1), 327-387.
63. Choi, A. J., & Ryter, S. W. (2014). Inflammasomes: molecular regulation and implications for metabolic and cognitive diseases. *Molecules and cells*, 37(6), 441.
64. Church, L. D., & McDermott, M. F. (2009). Canakinumab, a fully-human mAb against IL-1 $\beta$  for the potential treatment of inflammatory disorders. *Curr Opin Mol Ther*, 11(1), 81-9.
65. Clark, P. R., Manes, T. D., Pober, J. S., & Kluger, M. S. (2007). Increased ICAM-1 expression causes endothelial cell leakiness, cytoskeletal reorganization and junctional alterations. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 762-774.
66. Coll, R. C., Robertson, A. A., Chae, J. J., Higgins, S. C., Muñoz-Planillo, R., Inerra, M. C., Vetter, I., Dungan, L. S., Monks, B. G., Stutz, A., Croker, D. E., Butler, M. S., Haneklaus, M., Sutton, C. E., Núñez, G., Latz, E., Kastner, D. L., Mills, K. H., Masters, S. L., Schroder, K., Cooper, M.A. & O'Neill, L. A. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine*, 21(3), 248.
67. Collins, T., & Cybulsky, M. I. (2001). NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?. *The Journal of clinical investigation*, 107(3), 255-264.
68. Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E., & Abdala-Valencia, H. (2011). Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), 1607-1638.
69. Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 271.
70. Cross, J. (2002). Endothelial dysfunction in uraemia. *Blood purification*, 20(5), 459-461.
71. Cybulsky, M. I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J. C., Connely, P. W., & Milstone, D. S. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 107(10), 1255-1262.
72. Dahl, T. B., Holm, S., Aukrust, P., & Halvorsen, B. (2012). Visfatin/NAMPT: a multifaceted molecule with diverse roles in physiology and pathophysiology. *Annual review of nutrition*, 32, 229-243.
73. Dahl, T. B., Yndestad, A., Skjelland, M., Øie, E., Dahl, A., Michelsen, A., Damas, J. K., Tunheim, S. V., Ueland, T., Smith, C., Bendz, B., Tonstad, S., Gullerstad, L., Froland, S. S., Krohg-Sorensen, K., Russell, D., Aukrust, P., & Halvorsen, B. (2007). Clinical perspective. *Circulation*, 115(8), 972-980.
74. Dalamaga, M., Christodoulatos, G. S., & Mantzoros, C. S. (2018). The role of extracellular and intracellular Nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism*.

75. Dalmas, E., Venteclef, N., Caer, C., Poitou, C., Cremer, I., Aron-Winewsky, J., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J., Kaveri, S. V., Clément, K., André, S., & Guerre-Millo, M. (2014). T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, DB\_131511.
76. Danese, S., Dejana, E., & Fiocchi, C. (2007). Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *The Journal of Immunology*, 178(10), 6017-6022.
77. Dauphinee, S. M., & Karsan, A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Laboratory investigation*, 86(1), 9.
78. De Alba, E. (2009). Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.
79. De Batista, P. R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Médici, C. T., Silva, M. A., Rossi, E. M., Aguado, A., Vassallo, D. V., Salaiques, M., & Alonso, M. J. (2014). Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PloS one*, 9(8), e104020.
80. De Meyer, G. R., & Herman, A. G. (1997). Vascular endothelial dysfunction. *Progress in cardiovascular diseases*, 39(4), 325-342.
81. Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10), 1285-1295.
82. Debreczeni, B., Veresh, Z., Gara, E., Marki, A., Racz, A., Matics, R., Hamar, J., & Koller, A. (2013). Hydrogen peroxide via thromboxane A<sub>2</sub> receptors mediates myogenic response of small skeletal muscle veins in rats. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 54(4), 393-407.
83. Deng, X., Huang, W., Peng, J., Zhu, T. T., Sun, X. L., Zhou, X. Y., Yang, H., Xioung, J. F., He, H. Q., Xu, Y. H. & He, Y. Z. (2018). Irisin alleviates advanced glycation end products-induced inflammation and endothelial dysfunction via inhibiting ROS-NLRP3 inflammasome signaling. *Inflammation*, 41(1), 260-275.
84. Dessy, C., Feron, O., & Balligand, J. L. (2010). The regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolin: a paradigm validated in vivo and shared by the 'endothelium-derived hyperpolarizing factor'. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 459(6), 817-827.
85. Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095-2147.
86. Dinarello, C. A. (2011). A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. *European journal of immunology*, 41(5), 1203-1217.
87. Dinarello, C. A., Donath, M. Y., & Mandrup-Poulsen, T. (2010). Role of IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 17(4), 314-321.
88. Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G., & Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *The Journal of Immunology*, 139(6), 1902-1910.
89. Dinarello, C. A., Simon, A., & Van Der Meer, J. W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 11(8), 633.
90. Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Kemp-Harper, B. K., Diep, H., De Silva, T. M., Kim, H. A., Vinh, A., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Mansell, A., Chrissobolis, S. & Sobey, C. (2017). Pressor response to angiotensin II is enhanced in aged mice and associated with inflammation, vasoconstriction and oxidative stress. *Aging (Albany NY)*, 9(6), 1595.
91. Dolinsky, V. W., Cole, L. K., Sparagna, G. C., & Hatch, G. M. (2016). Cardiac mitochondrial energy metabolism in heart failure: Role of cardiolipin and sirtuins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(10), 1544-1554.
92. Donath, M. Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nature reviews Drug discovery*, 13(6), 465-476.
93. Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98.
94. Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(9), 452-463.



95. Du, X., Edelstein, D., Obici, S., Higham, N., Zou, M. H., & Brownlee, M. (2006). Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *The Journal of clinical investigation*, 116(4), 1071-1080.
96. Dudzinski, D. M., & Michel, T. (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovascular research*, 75(2), 247-260.
97. Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela G. S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, E. L., & Espevik, T. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464(7293), 1357.
98. Durán, W. N., Breslin, J. W., & Sánchez, F. A. (2010). The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovascular research*, 87(2), 254-261.
99. El-Mesallamy, H. O., Kassem, D. H., El-Demerdash, E., & Amin, A. I. (2011). Vaspin and visfatin/Nampt are interesting interrelated adipokines playing a role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 60(1), 63-70.
100. El-Shishtawy, S. H., Mosbah, O., Sherif, N., Metwaly, A., Hanafy, A., & Kamel, L. (2016). Association between serum visfatin and carotid atherosclerosis in diabetic and non-diabetic patients on maintenance hemodialysis. *Electronic physician*, 8(2), 1966.
101. Ellinsworth, D. C., Sandow, S. L., Shukla, N., Liu, Y., Jeremy, J. Y., & Gutterman, D. D. (2016). Endothelium-derived hyperpolarization and coronary vasodilation: diverse and integrated roles of epoxyeicosatrienoic acids, hydrogen peroxide, and gap junctions. *Microcirculation*, 23(1), 15-32.
102. Engin, A. (2017). The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation. In *Obesity and Lipotoxicity* (pp. 221-245). Springer, Cham.
103. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews*, 23(5), 599-622.
104. Everett, B. M., Donath, M. Y., Pradhan, A. D., Thuren, T., Pais, P., Nicolau, J. C., Glynn, R. J., Libby, P. & Ridker, P. M. (2018). Anti-inflammatory therapy with canakinumab for the prevention and management of diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(21), 2392-2401.
105. Fan, Y., Meng, S., Wang, Y., Cao, J., & Wang, C. (2011). Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT-MAPK (p38, ERK1/2)-NF- $\kappa$ B signaling pathway. *International journal of molecular medicine*, 27(4), 607-615.
106. Faraci, F. M., & Didion, S. P. (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(8), 1367-1373.
107. Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 36(7), 461-470.
108. Feng, J., Liu, Y., Chu, L. M., Clements, R. T., Khabbaz, K. R., Robich, M. P., Bianchi, C. & Sellke, F. W. (2011). Thromboxane-induced contractile response of human coronary arterioles is diminished after cardioplegic arrest. *The Annals of thoracic surgery*, 92(3), 829-836.
109. Fernández, I., Martín-Garrido, A., Zhou, D. W., Clempus, R. E., Seidel-Rogol, B., Valdivia, A., Lassègue, B., García, A. J., Griendling, K. K., & San Martín, A. (2015). Hic-5 Mediates TGF $\beta$ -Induced Adhesion in Vascular Smooth Muscle Cells by a Nox4-Dependent Mechanism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(5), 1198-1206.
110. Filippatos, T. D., Derdemezis, C. S., Gazi, I. F., Lagos, K., Kiortsis, D. N., Tselepis, A. D., & Elisaf, M. S. (2008). Increased plasma visfatin levels in subjects with the metabolic syndrome. *European journal of clinical investigation*, 38(1), 71-72.
111. Filippatos, T. D., Randeve, H. S., Derdemezis, C. S., Elisaf, M. S., & Mikhailidis, D. P. (2010). Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Current Vascular Pharmacology*, 8(1), 12-28.
112. Formentini, L., Moroni, F., & Chiarugi, A. (2009). Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) in vitro and in vivo. *Biochemical pharmacology*, 77(10), 1612-1620.
113. Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 459(6), 923-939.
114. Förstermann, U., & Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714.

115. Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
116. Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research*, 120(4), 713-735.
117. Freitas Lima, L. C., Braga, V. D. A., do Socorro de França Silva, M., Cruz, J. D. C., Sousa Santos, S. H., de Oliveira Monteiro, M. M., & Balarini, C. D. M. (2015). Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Frontiers in physiology*, 6, 304.
118. Friebe, D., Neef, M., Kratzsch, J., Erbs, S., Dittrich, K., Garten, A., Petzold-Quinque, S., Blüher, S., Reinehr, T., Stumvoll, M., Blüher, M., Kiess, W., & Körner, A. (2011). Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia*, 54(5), 1200-1211.
119. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), 1583-1606.
120. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y., & Shimomura I. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307(5708), 426-430.
121. Gallí, M., Van Gool, F., Rongvaux, A., Andris, F., & Leo, O. (2010). The nicotinamide phosphoribosyltransferase: a molecular link between metabolism, inflammation, and cancer. *Cancer research*, 70(1), 8-11.
122. Galli, U., Travelli, C., Massarotti, A., Fakhfour, G., Rahimian, R., Tron, G. C., & Genazzani, A. A. (2013). Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 56(16), 6279-6296.
123. Garavaglia, S., Bruzzone, S., Cassani, C., Canella, L., Allegrone, G., Sturla, L., Mannino, E., De Flora, A. & Rizzi, M. (2012). The high-resolution crystal structure of periplasmic Haemophilus influenzae NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism. *Biochemical Journal*, 441(1), 131-141.
124. García-Redondo, A. B., Aguado, A., Briones, A. M., & Salices, M. (2016). NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacological research*, 114, 110-120.
125. Garten, A., Petzold, S., Barnikol-Oettler, A., Körner, A., Thasler, W. E., Kratzsch, J., Kless, W., & Gebhardt, R. (2010). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), 376-381.
126. Garten, A., Petzold, S., Körner, A., Imai, S. I., & Kiess, W. (2009). Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends in endocrinology & metabolism*, 20(3), 130-138.
127. Garten, A., Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., De Giorgis, T., & Kiess, W. (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(9), 535.
128. Gimbrone Jr, M. A., & García-Cardeña, G. (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), 620-636.
129. Gray, S. P., Di Marco, E., Kennedy, K., Chew, P., Okabe, J., El-Osta, A., Calkin, A. C., Blessen, E. A., Touyz, R. M., Cooper, M. E., Schmidt, H. H., & Jandeleit-Dahm, K. A. (2016). Reactive oxygen species can provide atheroprotection via NOX4-dependent inhibition of inflammation and vascular remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 36(2), 295-307.
130. Gray, S. P., Di Marco, E., Okabe, J., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Montezano, A. C., de Haan, J. B., Koulis, C., Ell-Osta, A., Andrews, K. L., Ching-Dusting, J. P., Tpuyz, R. M., Cooper, M. E., Schmidt, H. H., & Jandeleit-Dahm, K. A. (2013). Nox1 plays a key role in diabetes accelerated atherosclerosis. *Circulation*, *Circulation*
131. *AHA*-112.
132. Greig, F. H., Ewart, M. A., McNaughton, E., Cooney, J., Spickett, C. M., & Kennedy, S. (2015). The hypotensive effect of acute and chronic AMP-activated protein kinase activation in normal and hyperlipidemic mice. *Vascular pharmacology*, 74, 93-102.
133. Grenier, J. M., Wang, L., Manji, G. A., Huang, W. J., Al-Garawi, A., Kelly, R., Carlson, A., Merriam, S., Lora, J. M., Briskin, M., DiStefano, P. S. & Bertin, J. (2002). Functional

- screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF- $\kappa$ B and caspase-1. *FEBS letters*, 530(1-3), 73-78.
134. Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M. (2000). NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*, 86(5), 494-501.
  135. Grolla, A. A., Torretta, S., Gnemmi, I., Amoruso, A., Orsomando, G., Gatti, M., Caldarelli, A., Lim, D., Penengo, L., Brunelleschi, S., Genazzani, A. A., & Travelli, C. (2015). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoural cytokine released from melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 28(6), 718-729.
  136. Gross, O., Thomas, C. J., Guarda, G., & Tschopp, J. (2011). The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews*, 243(1), 136-151.
  137. Grzywocz, P., Mizia-Stec, K., Wybraniec, M., & Chudek, J. (2015). Adipokines and endothelial dysfunction in acute myocardial infarction and the risk of recurrent cardiovascular events. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 16(1), 37-44.
  138. Gualillo, O., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2007). The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends in cardiovascular medicine*, 17(8), 275-283.
  139. Guerrero-García, J. D. J., Carrera-Quintanar, L., López-Roa, R. I., Márquez-Aguirre, A. L., Rojas-Mayorquín, A. E., & Ortuño-Sahagún, D. (2016). Multiple sclerosis and obesity: possible roles of adipokines. *Mediators of inflammation*, 2016.
  140. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 367.
  141. Guo, W., Liu, W., Jin, B., Geng, J., Li, J., Ding, H., Wu, X., Xu, Q., Sun, Y., & Gao, J. (2015). Asiatic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via suppressing mitochondria-mediated NLRP3 inflammasome activation. *International immunopharmacology*, 24(2), 232-238.
  142. Guo, Z., Ran, Q., Roberts II, L. J., Zhou, L., Richardson, A., Sharan, C., Wu, D., & Yang, H. (2008). Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), 343-352.
  143. Guzik, T. J., Chen, W., Gongora, M. C., Guzik, B., Lob, H. E., Mangalat, D., Hoch, N., Dikalov, S., Rudzinski, P., Kapelak, B., Sadowski, J. & Harrison, D. G. (2008). Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(22), 1803-1809.
  144. Haider, D. G., Schaller, G., Kapiotis, S., Maier, C., Luger, A., & Wolzt, M. (2006). The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetologia*, 49(8), 1909-1914.
  145. Haider, D. G., Schindler, K., Schaller, G., Prager, G., Wolzt, M., & Ludvik, B. (2006b). Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(4), 1578-1581.
  146. Hajianfar, H., Bahonar, A., Entezari, M. H., Askari, G., & Yazdani, M. (2012). Lipid profiles and serum visfatin concentrations in patients with type II diabetes in comparison with healthy controls. *International journal of preventive medicine*, 3(5), 326.
  147. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., & Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(3), 753-768.
  148. Han, B. G., Hao, C. M., Tchekneva, E. E., Wang, Y. Y., Lee, C. A., Ebrahim, B., Harris, R. C., Kern, T. S., Wasserman, D. H., Breyer, M. D. & Qi, Z. (2008). Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h-and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(4), E981.
  149. Haneklaus, M., & O'Neill, L. A. (2015). NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunological reviews*, 265(1), 53-62.
  150. Haneklaus, M., O'Neill, L. A., & Coll, R. C. (2013). Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Current opinion in immunology*, 25(1), 40-45.
  151. Hansson, G. K., & Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 6(7), 508.
  152. Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., & Tsuchiya, M. (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PLoS one*, 6(8), e22781.

153. Harrison, D. G. (2014). The immune system in hypertension. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 125, 130.
154. Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., & Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*, 91(3), 7-11.
155. Hasmann, M., & Schemainda, I. (2003). FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer research*, 63(21), 7436-7442.
156. Hassan, S. B., Lövborg, H., Lindhagen, E., Karlsson, M. O., & Larsson, R. (2006). CHS 828 kill tumour cells by inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B translocation but unlikely through down-regulation of proteasome. *Anticancer research*, 26(6B), 4431-4436.
157. Hauner, H. (2005). Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(2), 163-169.
158. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell*, 132(3), 344-362.
159. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF- $\kappa$ B in immunobiology. *Cell research*, 21(2), 223.
160. He, Y., Hara, H., & Núñez, G. (2016). Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in biochemical sciences*, 41(12), 1012-1021.
161. He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B., & Núñez, G. (2016b). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, 530(7590), 354.
162. Herder, C., Brunner, E. J., Rathmann, W., Strassburger, K., Tabák, A. G., Schloot, N. C., & Witte, D. R. (2009). Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study. *Diabetes care*, 32(3), 421-423.
163. Herder, C., Carstensen, M., & Ouwens, D. M. (2013). Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15(s3), 39-50.
164. Herder, C., Dalmas, E., Böni-Schnetzler, M., & Donath, M. Y. (2015). The IL-1 pathway in type 2 diabetes and cardiovascular complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(10), 551-563.
165. Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., Martín, A., Cachofeiro, V., Aguado, A., García-Redondo, L., Barrús, M. T., de Batista, P. R., Briones, A. M., Salaices, M. & Alonso, M. J. (2015). Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *British journal of pharmacology*, 172(12), 3159-3176.
166. Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H. H., Busse, R., Schröder, K., & Brandes, R. P. (2008). Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension*, 51(2), 211-217.
167. Heyes, M. P., Eugene, O., & Saito, K. (1997). Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochemical Journal*, 326(2), 351-356.
168. Hirose, A., Tanikawa, T., Mori, H., Okada, Y., & Tanaka, Y. (2010). Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS letters*, 584(1), 61-66.
169. Hoffmann, A., & Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor  $\kappa$ B signaling. *Immunological reviews*, 210(1), 171-186.
170. Holen, K., Saltz, L. B., Hollywood, E., Burk, K., & Hanauske, A. R. (2008). The pharmacokinetics, toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis inhibitor. *Investigational new drugs*, 26(1), 45-51.
171. Hoseini, Z., Sepahvand, F., Rashidi, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., & Mirzaei, H. (2018). NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2116-2132.
172. Hovstadius, P., Larsson, R., Jonsson, E., Skov, T., Kissmeyer, A. M., Krasilnikoff, K., Bergh, J., Karisson, M. O., Lönnebo, A., & Ahlgren, J. (2002). A Phase I study of CHS 828 in patients with solid tumor malignancy. *Clinical cancer research*, 8(9), 2843-2850.
173. Hsu, C. Y., Huang, P. H., Chen, T. H., Chiang, C. H., Leu, H. B., Huang, C. C., Chen, J. W. & Lin, S. J. (2015). Increased circulating visfatin is associated with progression of kidney disease in non-diabetic hypertensive patients. *American journal of hypertension*, 29(4), 528-536.
174. Hu, F. B., Meigs, J. B., Li, T. Y., Rifai, N., & Manson, J. E. (2004). Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes*, 53(3), 693-700.

175. Hua, K. F., Chou, J. C., Ka, S. M., Tasi, Y. L., Chen, A., Wu, S. H., Chiu, H. W., Wong, W. T., Wang, Y. F., Tsai, C. L., Ho, C. L. & Lin, C. H. (2015). Cyclooxygenase-2 Regulates NLRP3 Inflammasome-Derived IL-1 $\beta$  Production. *Journal of cellular physiology*, 230(4), 863-874.
176. Huang, S. W., Kuo, H. L., Hsu, M. T., Tseng, Y. J., Lin, S. W., Kuo, S. C., Peng, H. C., Lien, J. C. & Huang, T. F. (2016). A novel thromboxane receptor antagonist, nstpbp5185, inhibits platelet aggregation and thrombus formation in animal models. *Thrombosis and haemostasis*, 116(08), 285-299.
177. Huber, S. A., Sakkinen, P., Conze, D., Hardin, N., & Tracy, R. (1999). Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(10), 2364-2367.
178. Hung, W. C., Yu, T. H., Hsu, C. C., Lu, L. F., Chung, F. M., Tsai, I. T., Lu, Y. C., Houg, J. Y., Lee, Y. J. & Wang, C. P. (2015). Plasma visfatin levels are associated with major adverse cardiovascular events in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Clinical & Investigative Medicine*, 38(3), 100-109.
179. Ismael, S., Nasoohi, S., & Ishrat, T. (2018). MCC950, the selective NLRP3 inflammasome inhibitor protects mice against traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 1;35(11):1294-1303.
180. Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, 148(1), 241-251.
181. Janssen-Heininger, Y. M., Poynter, M. E., & Baeuerle, P. A. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kb. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1317-1327.
182. Jesus, A. A., & Goldbach-Mansky, R. (2014). IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annual review of medicine*, 65, 223-244.
183. Jialal, I., Kaur, H., & Devaraj, S. (2014). Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(1), 39-48.
184. Jing, Z., Xing, J., Chen, X., Stetler, R. A., Weng, Z., Gan, Y., Zhang, F., Gao, Y., Chen, J., Leak, R. K., & Cao, G. (2014). Neuronal NAMPT is released after cerebral ischemia and protects against white matter injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(10), 1613-1621.
185. Johnson, D. K., Schillinger, K. J., Kwait, D. M., Hughes, C. V., McNamara, E. J., Ishmael, F., O'Donnell, R. W., Chang, M. M., Hogg, M. G., Dordick, J. S., Santhanam, L., Ziegler, L. M., & Holand, J. A. (2002). Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*, 9(3), 191-203.
186. Jung, U. J., & Choi, M. S. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 6184-6223.
187. Kacso, A. C., Bondor, C. I., Coman, A. L., Potra, A. R., & Georgescu, C. E. (2016). Determinants of visfatin in type 2 diabetes patients with diabetic kidney disease: Relationship to inflammation, adiposity and undercarboxylated osteocalcin. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 76(3), 217-225.
188. Kadoglou, N. P. E., Sailer, N., Moumtzouoglou, A., Kapelouzou, A., Tsanikidis, H., Vitta, I., Karkos, C., Karayannacos, E., Gerasimidis, T. & Liapis, C. D. (2010). Visfatin (nampt) and ghrelin as novel markers of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 118(02), 75-80.
189. Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T., & Daiber, A. (2014). eNOS uncoupling in cardiovascular diseases-the role of oxidative stress and inflammation. *Current pharmaceutical design*, 20(22), 3579-3594.
190. Karin, M., & Delhase, M. (2000, February). The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signalling. In *Seminars in immunology* (Vol. 12, No. 1, pp. 85-98). Academic Press.
191. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373.
192. Kelley, E. E. (2015). A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. *Pharmacological Reports*, 67(4), 669-674.

193. Khaddaj Mallat, R., Mathew John, C., Kendrick, D. J., & Braun, A. P. (2017). The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 54(7-8), 458-470.
194. Kim, H. S., Han, S. Y., Sung, H. Y., Park, S. H., Kang, M. K., Han, S. J., & Kang, Y. H. (2014). Blockade of visfatin induction by oleanolic acid via disturbing IL-6-TRAF6-NF- $\kappa$ B signaling of adipocytes. *Experimental biology and medicine*, 239(3), 284-292.
195. Kim, J. Y., Van De Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M. E., Hofmann, S. M., Schraw, T., Durand, J. L., Li, H., Li, G., Jelicks, L. A., Mehler, M. F., Hui, D. Y., Deshaies, Y., Shulman, G. I., Schwartz, G. J. & Scherer, P. E. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 117(9), 2621-2637.
196. Kim, M. K., Lee, J. H., Kim, H., Park, S. J., Kim, S. H., Kang, G. B., Lee, Y. S., Kim, J. B., Kim, K. K., Suh, S. W., & Eom, S. H. (2006). Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *Journal of molecular biology*, 362(1), 66-77.
197. Kim, S. R., Bae, S. K., Choi, K. S., Park, S. Y., Jun, H. O., Lee, J. Y., Jang, H. O., Yun, I., Yoon, K. H., Kim, Y. J., Yoo, M. A., Kim, K. W., & Bae, M. K. (2007). Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Biochemical and biophysical research communications*, 357(1), 150-156.
198. Kim, S. R., Bae, Y. H., Bae, S. K., Choi, K. S., Yoon, K. H., Koo, T. H., Jang, H. O., Yun, I., Kim, K. W., Kwon, Y. G., Yoo, M. A., & Bae, M. K. (2008). Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(5), 886-895.
199. Kim, S. R., Jung, Y. H., Park, H. J., Kim, M. K., Jeong, J. W., Jang, H. O., ... & Bae, M. K. (2012). Upregulation of thromboxane synthase mediates visfatin-induced interleukin-8 expression and angiogenic activity in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 418(4), 662-668.
200. Kinoshita, H., Matsumura, T., Ishii, N., Fukuda, K., Senokuchi, T., Motoshima, H., Kondo, T., Taketa, K., Kawasaki, S., Hanatani, S., Nishikawa, T., Araki, E & Takeya, M. (2013). Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 431(2), 124-130.
201. Kitani, T., Okuno, S., & Fujisawa, H. (2003). Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS letters*, 544(1-3), 74-78.
202. Kocelak, P., Olszanecka-Glinianowicz, M., Owczarek, A., Bożentowicz-Wikarek, M., Brzozowska, A., Mossakowska, M., ... & Chudek, J. (2015). Plasma visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase levels in hypertensive elderly—results from the PolSenior substudy. *Journal of the American Society of Hypertension*, 9(1), 1-8.
203. Koka, S., Xia, M., Chen, Y., Bhat, O. M., Yuan, X., Boini, K. M., & Li, P. L. (2017). Endothelial NLRP3 inflammasome activation and arterial neointima formation associated with acid sphingomyelinase during hypercholesterolemia. *Redox biology*, 13, 336-344.
204. Kolb, H., & Mandrup-Poulsen, T. (2010). The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia*, 53(1), 10-20.
205. Konior, A., Schramm, A., Czesnikiewicz-Guzik, M., & Guzik, T. J. (2014). NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants & redox signaling*, 20(17), 2794-2814.
206. Koumaki, V., & Dalamaga, M. (2012). Nampt (nicotinamide phosphoribosyltransferase). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 16, 12.
207. Kovács, D., Lovászi, M., Póliska, S., Oláh, A., Bíró, T., Veres, I., Zouboulis, C. C., Stahle, M., Rühl, R., Remenyik, E. & Töröcsik, D. (2016). Sebocytes differentially express and secrete adipokines. *Experimental dermatology*, 25(3), 194-199.
208. Kover, K., Tong, P. Y., Watkins, D., Clements, M., Stehno-Bittel, L., Novikova, L., Bittel, D., Kibiryeveva, N., Stuhlsatz, J., Yan, Y., Moore, W. V. & Ye, S. Q. (2013). Expression and regulation of nampt in human islets. *PLoS One*, 8(3), e58767.
209. Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., & Fasshauer, M. (2005). Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Endocrinology*, 185(3), R1-R8.
210. Kralisch, S., Klein, J., Lossner, U., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., & Fasshauer, M. (2005b). Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1

- adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 289(4), E586-E590.
211. Krishnan, S. M., Dowling, J. K., Ling, Y. H., Diep, H., Chan, C. T., Ferens, D., Kett, M. M., Pinar, A., Samuel, C. S., Vinh, A., Arumugam, T. V., Hewitson, T. D., Kemp-Harper, B. K., Robertson, A. A., Cooper, M. A., Latz, E., Mansell, A., Sobey, C. G. & Drummond G. R. (2016). Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *British journal of pharmacology*, 173(4), 752-765.
  212. Krishnan, S. M., Sobey, C. G., Latz, E., Mansell, A., & Drummond, G. R. (2014). IL-1 $\beta$  and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension?. *British journal of pharmacology*, 171(24), 5589-5602.
  213. Kyle, B. D., & Braun, A. P. (2014). The regulation of BK channel activity by pre-and post-translational modifications. *Frontiers in physiology*, 5, 316.
  214. Lafuente, N., Matesanz, N., Azcutia, V., Romacho, T., Nevado, J., Rodríguez-Mañas, L., Peiró, C., & Sánchez-Ferrer, C. F. (2008). The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *Journal of hypertension*, 26(3), 478-485.
  215. Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022.
  216. Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Vølund, A., Ehses, J. A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T. & Donath, M. Y. (2007). Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 356(15), 1517-1526.
  217. Lassègue, B., & Griendling, K. K. (2010). NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(4), 653-661.
  218. Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation research*, 110(10), 1364-1390.
  219. Lee, W. J., Wu, C. S., Lin, H., Lee, I. T., Wu, C. M., Tseng, J. J., Chou, M. M., & Sheu, W. H. (2009). Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF- $\kappa$ B pathway. *International journal of obesity*, 33(4), 465.
  220. Leemans, J. C., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2011). Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunological reviews*, 243(1), 152-162.
  221. Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(1), 208-219.
  222. Li, Y., Wang, H., Zhou, X., Xie, X., Chen, X., Jie, Z., Zou, Q., Hu, H., Zhu, L., Cheng, X., Brightbill, H. D., Wu, L. C., Wang, L., Sun, S.C. (2016). Cell intrinsic role of NF- $\kappa$ B-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses. *Scientific reports*, 6, 22115.
  223. Li, Y., Zhang, Y., Dorweiler, B., Cui, D., Wang, T., Woo, C. W., Brunkan, C. S., Wolberger, C., Imai, S., & Tabas, I. (2008). Extracellular Namp1 promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), 34833-34843.
  224. Liakos, C. I., Sanidas, E. A., Perrea, D. N., Grassos, C. A., Chantziara, V., Viniou, N. A., Barbetseas, J. D. & Papadopoulos, D. P. (2015). Apelin and visfatin plasma levels in healthy individuals with high normal blood pressure. *American journal of hypertension*, 29(5), 549-552.
  225. Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2045-2051.
  226. Libby, P., & Ridker, P. M. (2006). Inflammation and atherothrombosis: from population biology and bench research to clinical practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(9 Supplement), A33-A46.
  227. Libby, P., Ordovas, J. M., Auger, K. R., Robbins, A. H., Birinyi, L. K., & Dinarello, C. A. (1986). Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *The American journal of pathology*, 124(2), 179.
  228. Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P., & Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: good or bad?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 370-375.
  229. Ling, Y. H., Krishnan, S. M., Chan, C. T., Diep, H., Ferens, D., Chin-Dusting, J., Kemp-Harper, B. K., Samuel, C. S., Hewitson, T. D., Latz, E., Sobey, C. G., Drummond, G. R.,

- & Mansell, A. (2017). Anakinra reduces blood pressure and renal fibrosis in one kidney/DOCA/salt-induced hypertension. *Pharmacological research*, 116, 77-86.
230. Liu, R. M., & Desai, L. P. (2015). Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis. *Redox biology*, 6, 565-577.
231. Liu, S. W., Qiao, S. B., Yuan, J. S., & Liu, D. Q. (2009). Association of plasma visfatin levels with inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes (ACS) in humans. *Clinical endocrinology*, 71(2), 202-207.
232. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023.
233. Loot, A. E., Schreiber, J. G., Fisslthaler, B., & Fleming, I. (2009). Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 2889-2896.
234. Loscalzo, J. (2013). The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circulation research*, 113(2), 100-103.
235. Lozhkin, A., Vendrov, A. E., Pan, H., Wickline, S. A., Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2017). NADPH oxidase 4 regulates vascular inflammation in aging and atherosclerosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 102, 10-21.
236. Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
237. Lu, Y., Zhang, L., Liao, X., Sangwung, P., Prosdocimo, D. A., Zhou, G., Votruba, A. R., Brian, L., Han, Y. J., Gao, H., Shimizu, K., Weinert-Stein, K., Khrestian, M., Simon, D. I., Freedman, N. J., Jain, M. K. & Wang, Y. (2013). Kruppel-like factor 15 is critical for vascular inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 123(10), 4232-4241.
238. Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 15(7), 1957-1997.
239. Ludwig-Portugall, I., Bartok, E., Dhana, E., Evers, B. D., Primiano, M. J., Hall, J. P., Franklin, B. S., Knolle, P. A., Hornung, V., Hartmann, G., Boor, P., Latz, E. & Kurts, C. (2016). An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates crystal-induced kidney fibrosis in mice. *Kidney international*, 90(3), 525-539.
240. Luk, T., Malam, Z., & Marshall, J. C. (2008). Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *Journal of leukocyte biology*, 83(4), 804-816.
241. Luo, B., Li, B., Wang, W., Liu, X., Xia, Y., Zhang, C., ... & An, F. (2014). NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One*, 9(8), e104771.
242. Maedler, K., Dharmadhikari, G., Schumann, D. M., & Størling, J. (2009). Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert opinion on biological therapy*, 9(9), 1177-1188.
243. Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P. A. & Donath, M. Y. (2002). Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of clinical investigation*, 110(6), 851-860.
244. Magnone, M., Bauer, I., Poggi, A., Mannino, E., Sturla, L., Brini, M., Zocchi, E., De Flora, A., Nencioni, A. & Bruzzone, S. (2012). NAD<sup>+</sup> levels control Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> stores replenishment and mitogen-induced increase of cytosolic Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> by ADPR-dependent TRPM2 gating in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M111.
245. Maijer, K. I., Noort, A. R., de Hair, M. J., van der Leij, C., van Zoest, K. P., Choi, I. Y., Gerlag, D. M., Maas, M., Tak, P. P. & Tas, S. W. (2015). Nuclear Factor- $\kappa$ B-inducing Kinase Is Expressed in Synovial Endothelial Cells in Patients with Early Arthritis and Correlates with Markers of Inflammation: A Prospective Cohort Study. *The Journal of rheumatology*, jrheum-150245.
246. Malyszko, J., Malyszko, J. S., & Mysliwiec, M. (2009, January). Visfatin, a new adipocytokine, is predominantly related to inflammation/endothelial damage in kidney allograft recipients. In *Transplantation proceedings* (Vol. 41, No. 1, pp. 150-153). Elsevier.
247. Man, S. M., & Kanneganti, T. D. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunological reviews*, 265(1), 6-21.



248. Manea, S. A., Constantin, A., Manda, G., Sasson, S., & Manea, A. (2015). Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox biology*, 5, 358-366.
249. Martin, P. R., Shea, R. J., & Mulks, M. H. (2001). Identification of a Plasmid-Encoded Gene from *Haemophilus ducreyi* Which Confers NAD Independence. *Journal of bacteriology*, 183(4), 1168-1174.
250. Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular cell*, 10(2), 417-426.
251. Matafome, P., & Seica, R. (2017). Function and dysfunction of adipose tissue. In *Obesity and Brain Function* (pp. 3-31). Springer, Cham.
252. Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., & Ii, M. (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular pharmacology*, 79(1), 34-41.
253. McCarthy, C. G., Goulopoulou, S., Wenceslau, C. F., Spitler, K., Matsumoto, T., & Webb, R. C. (2013). Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 306(2), H184-H196.
254. McDonald, L. J., & Murad, F. (1996). Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 211(1), 1-6.
255. Menu, P., Pellegrin, M., Aubert, J. F., Bouzourene, K., Tardivel, A., Mazzolai, L., & Tschopp, J. (2011). Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell death & disease*, 2(3), e137.
256. Meyer, M. R., Fredette, N. C., Barton, M., & Prossnitz, E. R. (2015). Prostanoid-mediated contractions of the carotid artery become Nox2-independent with aging. *Age*, 37(4), 79.
257. Michaeloudes, C., Sukkar, M. B., Khorasani, N. M., Bhavsar, P. K., & Chung, K. F. (2010). TGF- $\beta$  regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(2), L295-L304.
258. Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J. P., & Keane, R. W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia*, 61(7), 1113-1121.
259. Miyake, K. (2007, February). Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 1, pp. 3-10). Academic Press.
260. Moncada, S., & Higgs, E. A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. In *The vascular endothelium I* (pp. 213-254). Springer, Berlin, Heidelberg.
261. Moncada, S., Palmer, R. M., & Higgs, E. A. (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, 12(4), 365-372.
262. Montecucco, F., Bauer, I., Braunersreuther, V., Bruzzone, S., Akhmedov, A., Lüscher, T. F., Speer, T., Poggi, A., Mannino, E., Pelli, G., Galan, K., Bertolotto, M., Lenglet, S., Garuti, A., Montessuit, C., Lerch, R., Pellieux, C., Vuilleumier, N., Dallegri, F., Mage, J., Sebastian, C., Mostoslavsky, R., Gayet-Ageron, A., Patrone, F., Mach, F., & Nencioni, A. (2013). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase reduces neutrophil-mediated injury in myocardial infarction. *Antioxidants & redox signaling*, 18(6), 630-641.
263. Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2012). Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 110(1), 87-94.
264. Mooradian, A. D., Reed, R. L., Meredith, K. E., & Scuderi, P. (1991). Serum levels of tumor necrosis factor and IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in diabetic patients. *Diabetes Care*, 14(1), 63-65.
265. Mora-Pale, M., Kwon, S. J., Linhardt, R. J., & Dordick, J. S. (2012). Trimer hydroxylated quinone derived from apocynin targets cysteine residues of p47phox preventing the activation of human vascular NADPH oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(5), 962-969.
266. Moschen, A. R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H., & Tilg, H. (2007). Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1748-1758.

267. Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*, 73(2), 209-212.
268. Motawi, T. M., Shaker, O. G., El-Sawalhi, M. M., & Abdel-Nasser, Z. M. (2014). Visfatin-948 G/T and resistin-420 C/G polymorphisms in Egyptian type 2 diabetic patients with and without cardiovascular diseases. *Genome*, 57(5), 259-266.
269. Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., & Strijdom, H. (2012). Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*, 23(4), 222.
270. Mulvany, M. J., & Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*, 41(1), 19-26.
271. Nagy, K., Nagaraju, S. P., Rhee, C. M., Mathe, Z., & Molnar, M. Z. (2016). Adipocytokines in renal transplant recipients. *Clinical kidney journal*, 9(3), 359-373.
272. Naz, S., Sandhu, Q., Akhtar, A., Zafar, U., Khalid, A., & Saeed, M. (2017). Serum Levels of Visfatin and Interleukin-6 in Non-Obese Versus Obese Men with Coronary Artery Disease. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*, 27(2), 71-74.
273. Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a006049.
274. Nowak, K. L., Chonchol, M., Ikizler, T. A., Farmer-Bailey, H., Salas, N., Chaudhry, R., Wang, W., Smits, G., Tenegsdai, I., Dinarello, C.A., & Hung, A. M. (2016). IL-1 inhibition and vascular function in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, ASN-2016040453.
275. Nunemaker, C. S. (2016). Considerations for defining cytokine dose, duration, and milieu that are appropriate for modeling chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Journal of diabetes research*, 2016.
276. Nunes, K. P., de Oliveira, A. A., Szasz, T., Biancardi, V. C., & Webb, R. C. (2018). Blockade of Toll-Like Receptor 4 Attenuates Erectile Dysfunction in Diabetic Rats. *The journal of sexual medicine*, 15(9), 1235-1245.
277. Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a000034.
278. Ogletree, M. L., Harris, D. N., Greenberg, R. O. L. A. N. D., Haslanger, M. F., & Nakane, M. (1985). Pharmacological actions of SQ 29,548, a novel selective thromboxane antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 234(2), 435-441.
279. Ognjanovic, S., & Bryant-Greenwood, G. D. (2002). Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 187(4), 1051-1058.
280. Ognjanovic, S., Ku, T. L., & Bryant-Greenwood, G. D. (2005). Pre-B-cell colony-enhancing factor is a secreted cytokine-like protein from the human amniotic epithelium. *American journal of obstetrics and gynecology*, 193(1), 273-282.
281. Oh, H., & Ghosh, S. (2013). NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD 4+ T-cell subsets. *Immunological reviews*, 252(1), 41-51.
282. Olarescu, N. C., Ueland, T., Lekva, T., Dahl, T. B., Halvorsen, B., Aukrust, P., & Bollerslev, J. (2012). Adipocytes as a source of increased circulating levels of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin in active acromegaly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(4), 1355-1362.
283. Oldenburg, J., & de Rooij, J. (2014). Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell and tissue research*, 355(3), 545-555.
284. Olukman, M., Önal, A., Çelenk, F. G., Uyanıkgil, Y., Çavuşoğlu, T., Düzenli, N., & Ülker, S. (2018). Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. *Neural regeneration research*, 13(9), 1657.
285. Olukman, M., Orhan, C. E., Çelenk, F. G., & Ülker, S. (2010). Apocynin restores endothelial dysfunction in streptozotocin diabetic rats through regulation of nitric oxide synthase and NADPH oxidase expressions. *Journal of Diabetes and its Complications*, 24(6), 415-423.
286. Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., & Gabay, C. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family—Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 76(1), 25-37.
287. Park, K. H., & Park, W. J. (2015). Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *Journal of Korean medical science*, 30(9), 1213-1225.

288. Peiró, C., Lorenzo, Ó., Carraro, R., & Sánchez-Ferrer, C. F. (2017). IL-1 $\beta$  inhibition in cardiovascular complications associated to diabetes mellitus. *Frontiers in pharmacology*, 8, 363.
289. Peiró, C., Romacho, T., Azcutia, V., Villalobos, L., Fernández, E., Bolaños, J. P., Moncada, S. & Sánchez-Ferrer, C. F. (2016). Inflammation, glucose, and vascular cell damage: the role of the pentose phosphate pathway. *Cardiovascular diabetology*, 15(1), 82.
290. Peiró, C., Romacho, T., Carraro, R., & Sánchez-Ferrer, C. F. (2010). Visfatin/PBEF/Nampt: a new cardiovascular target?. *Frontiers in pharmacology*, 1, 135.
291. Pereira, M. M., Santos, T. P. S. A., Aras, R., Couto, R. D., Atta, M. L. B. S., & Atta, A. M. (2014). Serum levels of cytokines and chemokines associated with cardiovascular disease in Brazilian patients treated with statins for dyslipidemia. *International immunopharmacology*, 18(1), 66-70.
292. Perera, A. P., Fernando, R., Shinde, T., Gundamaraju, R., Southam, B., Sohal, S. S., Robertson, A. A., Schroder, K., Kinde, D., & Eri, R. (2018). MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. *Scientific reports*, 8(1), 8618.
293. Petrônio, M. S., Zeraik, M. L., Fonseca, L. M. D., & Ximenes, V. F. (2013). Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules*, 18(3), 2821-2839.
294. Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Samant, S., Moreno-Vinasco, L., Garcia, J. G., & Gupta, M. P. (2012). Nampt secreted from cardiomyocytes promotes development of cardiac hypertrophy and adverse ventricular remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304(3), H415-H426.
295. Pittelli, M., Formentini, L., Faraco, G., Lapucci, A., Rapizzi, E., Cialdai, F., Romano, G., Moneti, G., Moroni, F., & Chiarugi, A. (2010). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyl transferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M110.
296. Pober, J. S., & Cotran, R. S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiological reviews*, 70(2), 427-451.
297. Pober, J. S., & Gimbrone, M. A. (1982). Expression of Ia-like antigens by human vascular endothelial cells is inducible in vitro: demonstration by monoclonal antibody binding and immunoprecipitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(21), 6641-6645.
298. Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803.
299. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama*, 286(3), 327-334.
300. Qamar, A., & Rader, D. J. (2012). Effect of interleukin 1 $\beta$  inhibition in cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology*, 23(6), 548-553.
301. Qiao, Y., Wang, P., Qi, J., Zhang, L., & Gao, C. (2012). TLR-induced NF- $\kappa$ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS letters*, 586(7), 1022-1026.
302. Qin, Y. Y., Li, M., Feng, X., Wang, J., Cao, L., Shen, X. K., Chen, J., Sun, M., Sheng, R., Han, F., & Qin, Z. H. (2017). Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 333-345.
303. Rajamäki, K., Lappalainen, J., Öörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P. T., & Eklund, K. K. (2010). Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS one*, 5(7), e11765.
304. Ravaud, A., Cerny, T., Terret, C., Wanders, J., Bui, B. N., Hess, D., Droz, J. P., Fumoleau, P., & Twelves, C. (2005). Phase I study and pharmacokinetic of CHS-828, a guanidino-containing compound, administered orally as a single dose every 3 weeks in solid tumours: an EORTC/ESMO study. *European Journal of Cancer*, 41(5), 702-707.
305. Revollo, J. R., Grimm, A. A., & Imai, S. I. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50754-50763.
306. Revollo, J. R., Körner, A., Mills, K. F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R. R., Milbrandt, J., Kiess, W. & Imai, S. (2007).

- Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in  $\beta$  cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell metabolism*, 6(5), 363-375.
307. Rhee, S. G. (2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-1883.
308. Rhoads, J. P., Lukens, J. R., Wilhelm, A. J., Moore, J. L., Mendez-Fernandez, Y., Kanneganti, T. D., & Major, A. S. (2017). Oxidized low-density lipoprotein immune complex priming of the Nlrp3 inflammasome involves TLR and Fc $\gamma$ R cooperation and is dependent on CARD9. *The Journal of Immunology*, 1601563.
309. Richter, V., Rassoul, F., Purschwitz, K., Hentschel, B., Reuter, W., & Kuntze, T. (2003). Circulating vascular cell adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in dependence on aging. *Gerontology*, 49(5), 293-300.
310. Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Everett, B. M., Libby, P., Thuren, T., Glynn, R. J., & Varigos, J. (2018a). Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *The Lancet*, 391(10118), 319-328.
311. Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Glynn, R. J., Koenig, W., Libby, P., Everett, B. M., Lefkowitz, M. D., Thuren, T. & Cornel, J. H. (2018b). Inhibition of Interleukin-1 $\beta$  by Canakinumab and Cardiovascular Outcomes in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(21), 2405-2414.
312. Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Thuren, T., Everett, B. M., Libby, P., Glynn, R. J. & Cantos Trial Group. (2017). Effect of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 390(10105), 1833-1842.
313. Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J., & Hennekens, C. H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101(15), 1767-1772.
314. Ridker, P. M., Thuren, T., Zalewski, A., & Libby, P. (2011). Interleukin-1 $\beta$  inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *American heart journal*, 162(4), 597-605.
315. Rodríguez-Mañas, L., El-Assar, M., Vallejo, S., López-Dóriga, P., Solís, J., Petidier, R., Montes, M., Nevado, J., Castro, M., Gómez-Guerrero, C., Peiró, C. & Sánchez-Ferrer, C. F. (2009). Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging cell*, 8(3), 226-238.
316. Rollins, B. J., Yoshimura, T., Leonard, E. J., & Pober, J. S. (1990). Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *The American journal of pathology*, 136(6), 1229.
317. Romacho, T., Azcutia, V., Vazquez-Bella, M., Matesanz, N., Cercas, E., Nevado, J., Carraro, R., Rodríguez-Mañaz, L., Sánchez-Ferrer, C. F. & Peiro, C. (2009). Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia*, 52(11), 2455-2463.
318. Romacho, T., Sánchez-Ferrer, C. F., & Peiró, C. (2013a). Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators of inflammation*, 2013.
319. Romacho, T., Villalobos, L. A., Cercas, E., Carraro, R., Sánchez-Ferrer, C. F., & Peiró, C. (2013b). Visfatin as a novel mediator released by inflamed human endothelial cells. *PLoS One*, 8(10), e78283.
320. Rongvaux, A., Shea, R. J., Mulks, M. H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O., & Andris, F. (2002). Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *European journal of immunology*, 32(11), 3225-3234.
321. Saddi-Rosa, P., Oliveira, C. S., Crispim, F., Giuffrida, F. M., De Lima, V. C., Vieira, J. G., Doria, A., Velho, G. & Reis, A. F. (2013). Association of circulating levels of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/Visfatin) and of a frequent polymorphism in the promoter of the NAMPT gene with coronary artery disease in diabetic and non-diabetic subjects. *Cardiovascular diabetology*, 12(1), 119.
322. Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., del Carmen Basualdo, M., Guerrero-Vargas, N. N., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2013). Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One*, 8(4), e60052.

323. Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., & McNiece, I. (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and cellular biology*, 14(2), 1431-1437.
324. Sampath, D., Zabka, T. S., Misner, D. L., O'Brien, T., & Dragovich, P. S. (2015). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 151, 16-31.
325. Sandeep, S., Velmurugan, K., Deepa, R., & Mohan, V. (2007). Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. *Metabolism*, 56(4), 565-570.
326. Sarmiento, D., Montorfano, I., Cáceres, M., Echeverría, C., Fernández, R., Cabello-Verrugio, C., Cerda, O., Tapia, P., & Simon, F. (2014). Endotoxin-induced vascular endothelial cell migration is dependent on TLR4/NF- $\kappa$ B pathway, NAD (P) H oxidase activation, and transient receptor potential melastatin 7 calcium channel activity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 55, 11-23.
327. Sassá, M. F., Saturi, A. E., Souza, L. F., de Abreu Ribeiro, L. C., da Graca Sgarbi, D. B., & Carlos, I. Z. (2009). Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology*, 128(2), 301-309.
328. Schiffrin, E. L. (2014). Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clinical science*, 126(4), 267-274.
329. Schilling, E., & Hauschildt, S. (2012). Extracellular ATP induces P2X7-dependent nicotinamide phosphoribosyltransferase release in LPS-activated human monocytes. *Innate immunity*, 18(5), 738-744.
330. Schreiber, B. M. (2002). Serum amyloid A; in search of function. *Amyloid* 9(4):276-278.
331. Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832.
332. Segawa, K., Fukuhara, A., Hosogai, N., Morita, K., Okuno, Y., Tanaka, M., Nakagawa, Y., Kihara, S., Funahashi, T., Komuro, R., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2006). Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1 $\alpha$ -dependent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*, 349(3), 875-882.
333. Self-Medlin, Y., Byun, J., Jacob, R. F., Mizuno, Y., & Mason, R. P. (2009). Glucose promotes membrane cholesterol crystalline domain formation by lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(6), 1398-1403.
334. Semaan, H. B., Gurbel, P. A., Anderson, J. L., Muhlestein, J. B., Carlquist, J. F., Horne, B. D., & Serebruany, V. L. (2000). Soluble VCAM-1 and E-selectin, but not ICAM-1 discriminate endothelial injury in patients with documented coronary artery disease. *Cardiology*, 93(1-2), 7-10.
335. Sen, R., & Smale, S. T. (2010). Selectivity of the NF- $\kappa$ B response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(4), a000257.
336. Sessa, W. C. (2004). eNOS at a glance. *Journal of cell science*, 117(12), 2427-2429.
337. Shackelford, R. E., Mayhall, K., Maxwell, N. M., Kandil, E., & Coppola, D. (2013). Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review. *Genes & cancer*, 4(11-12), 447-456.
338. Shao, B. Z., Xu, Z. Q., Han, B. Z., Su, D. F., & Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers in pharmacology*, 6, 262.
339. Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., Su, L., Pratt, D., Bu, C. H., Hildebrand, S., Lyon, S., Scott, L., Quan, J., Sun, Q., Russell, J., Arnett, S., Jurek, P., Chen, D., Kravchenko, V. V., Mathison, J. C., Moresco, E. M., Monson, N. L., Ulevitch, R. J., & Beutler, B. (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nature immunology*, 17(3), 250.
340. Shi, K. L., Qian, J. Y., Qi, L., Mao, D. B., Chen, Y., Zhu, Y., & Guo, X. G. (2016). Atorvastatin antagonizes the visfatin-induced expression of inflammatory mediators via the upregulation of NF- $\kappa$ B activation in HCAECs. *Oncology letters*, 12(2), 1438-1444.
341. Shikama, Y., Aki, N., Hata, A., Nishimura, M., Oyadomari, S., & Funaki, M. (2015). Palmitate-stimulated monocytes induce adhesion molecule expression in endothelial cells via IL-1 signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 230(3), 732-742.
342. Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan V. K., Wolf, A., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., & Arditi, M. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*, 36(3), 401-414.
343. Shimokawa, H., & Matoba, T. (2004). Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacological research*, 49(6), 543-549.

344. Shoelson, S. E., Lee, J., & Yuan, M. (2003). Inflammation and the IKK $\beta$ /I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B axis in obesity-and diet-induced insulin resistance. *International journal of obesity*, 27(S3), S49.
345. Singla, D. K., Singla, R., & Wang, J. (2016). BMP-7 treatment increases M2 macrophage differentiation and reduces inflammation and plaque formation in Apo E-/-mice. *PLoS One*, 11(1), e0147897.
346. Solini, A., Rossi, C., Duranti, E., Taddei, S., Natali, A., & Viridis, A. (2016). Saxagliptin prevents vascular remodeling and oxidative stress in db/db mice. Role of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and cyclooxygenase. *Vascular pharmacology*, 76, 62-71.
347. Soncini, D., Caffa, I., Zoppoli, G., Cea, M., Cagnetta, A., Passalacqua, M., Mastracci, L., Boero, S., Montecucco, F., Sociali, G., Lasigliè, D., Damonte, P., Grozio, A., Maninno, E., Poggi, A., D'Agostino, V. G., Monacelli, F., Provenzani, A., Odetti, P., Ballesterio, A., Bruzzone, S. & Nencioni, A. (2014). Nicotinamide phosphoribosyltransferase promotes epithelial-to-mesenchymal transition as a soluble factor independent of its enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M114.
348. Sorescu, D., Weiss, D., Lassègue, B., Clempus, R. E., Szöcs, K., Sorescu, G. P., Valppu, L., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., Taylor, W. R., & Griendling, K. K. (2002). Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, 105(12), 1429-1435.
349. Spiekermann, S., Landmesser, U., Dikalov, S., Brecht, M., Gamez, G., Tatge, H., Reepschläger, N., Hornig, B., Drexler, H. & Harrison, D. G. (2003). Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD (P) H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*, 107(10), 1383-1389.
350. Spiroglou, S. G., Kostopoulos, C. G., Varakis, J. N., & Papadaki, H. H. (2010). Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 17(2), 115-130.
351. Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H., & Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52(3), 812-817.
352. Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J. & Loscalzo, J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(1), 444-448.
353. Stefanska, J., & Pawliczak, R. (2008). Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation*, 2008.
354. Stienstra, R., Joosten, L. A., Koenen, T., Van Tits, B., Van Diepen, J. A., Van Den Berg, S. A., Rensen, P. C., Voshoi, P. J., Fantuzzi, G., Hijmans, A., Kersten, S., Müller, M., van den Berg, W. B., van Rooijen, N., Wabitsch, M., Kulberg, B. J., van den Meer, J. W., Kanneganti, T., Tack, C. J., & Netea, M. G. (2010). The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell metabolism*, 12(6), 593-605.
355. Stolk, J., Hiltermann, T. J., Dijkman, J. H., & Verhoeven, A. J. (1994). Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 11(1), 95-102.
356. Strijdom, H., & Lochner, A. (2009). Cardiac endothelium: More than just a barrier: Cardiac endothelium. *SA Heart*, 6(3), 174-185.
357. Strijdom, H., Chamane, N., & Lochner, A. (2009). Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovascular journal of Africa*, 20(5), 303.
358. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278.
359. Su, Q., Li, L., Sun, Y., Yang, H., Ye, Z., & Zhao, J. (2018). Effects of the TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway on NLRP3 Inflammasome in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(4), 1497-1508.
360. Suganami, T., Nishida, J., & Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(10), 2062-2068.

361. Sumpter, K. M., Adhikari, S., Grishman, E. K., & White, P. C. (2011). Preliminary studies related to anti-interleukin-1 $\beta$  therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatric diabetes*, 12(7), 656-667.
362. Sun, P., Sun, H., Zhang, W., & Du, Z. (2017). Antagonist of thromboxane A2 receptor by SQ29548 lowers DOCA-induced hypertension in diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 815, 298-303.
363. Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell research*, 21(1), 71.
364. Sun, S. C., & Liu, Z. G. (2011). A special issue on NF- $\kappa$ B signaling and function. *Cell research*, 21(1), 1-2.
365. Suresh, R., & Mosser, D. M. (2013). Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Advances in physiology education*, 37(4), 284-291.
366. Takashima, K., Matsunaga, N., Yoshimatsu, M., Hazeki, K., Kaisho, T., Uekata, M., Kazeki, O., Akira, S., Iizawa, Y., & Ii, M. (2009). Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1250-1262.
367. Takebayashi, K., Suetsugu, M., Wakabayashi, S., Aso, Y., & Inukai, T. (2007). Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 56(4), 451-458.
368. Tan, X., Zheng, X., Huang, Z., Lin, J., Xie, C., & Lin, Y. (2017). Involvement of s100a8/a9-tlr4-nlrp3 inflammasome pathway in contrast-induced acute kidney injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(1), 209-222.
369. Tanaka, T., & Nabeshima, Y. I. (2007). Nampt/PBEF/Visfatin: a new player in  $\beta$  cell physiology and in metabolic diseases?. *Cell metabolism*, 6(5), 341-343.
370. Theeramunkong, S., Galli, U., Grolla, A. A., Caldarelli, A., Travelli, C., Massarotti, A., Troiani, M. P., Alisi, M. A., ORsomando, G., Genazzani, A., & Tron, G. C. (2015). Identification of a novel NAMPT inhibitor by combinatorial click chemistry and chemical refinement. *MedChemComm*, 6(10), 1891-1897.
371. Torzewski, M., Rist, C., Mortensen, R. F., Zwaka, T. P., Bienek, M., Waltenberger, J., Koenig, W., Schmitz, G., Hombach, V. & Torzewski, J. (2000). C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(9), 2094-2099.
372. Touyz, R. M. (2008). Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension*; 51; 172-174.
373. Trani, M., & Dejana, E. (2015). New insights in the control of vascular permeability: vascular endothelial-cadherin and other players. *Current opinion in hematology*, 22(3), 267-272.
374. Ueki, K., Kondo, T., & Kahn, C. R. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 24(12), 5434-5446.
375. Vallance, P. (2001). Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. *The Lancet*, 358(9299), 2096-2097.
376. Vallejo, S., Palacios, E., Romacho, T., Villalobos, L., Peiró, C., & Sánchez-Ferrer, C. F. (2014). The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular diabetology*, 13(1), 158.
377. Vallejo, S., Romacho, T., Angulo, J., Villalobos, L. A., Cercas, E., Leivas, A., Bermejo, E., Carraro, R., Sánchez-Ferrer, C. F. & Peiró, C. (2011). Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *PLoS One*, 6(11), e27299.
378. van Asseldonk, E. J., Stienstra, R., Koenen, T. B., Joosten, L. A., Netea, M. G., & Tack, C. J. (2011). Treatment with Anakinra improves disposition index but not insulin sensitivity in nondiabetic subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(7), 2119-2126.
379. Van den Worm, E., Beukelman, C. J., Van den Berg, A. J., Kroes, B. H., Labadie, R. P., & Van Dijk, H. (2001). Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *European journal of pharmacology*, 433(2-3), 225-230.
380. van der Heijden, T., Kritikou, E., Venema, W., van Duijn, J., van Santbrink, P. J., Slütter, B., Foks, A. C., Bot, I. & Kuiper, J. (2017). NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950

- Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, ATVBABA-117.
381. Van Hauwermeiren, F., & Lamkanfi, M. (2016). The NEK-sus of the NLRP3 inflammasome. *Nature immunology*, 17(3), 223.
  382. Van Hout, G. P., Bosch, L., Ellenbroek, G. H., De Haan, J. J., Van Solinge, W. W., Cooper, M. A., Arslan, F., de Jager, S. C., Robertson, A. A., Pasterkamp, G., & Hoefer, I. E. (2016). The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *European heart journal*, 38(11), 828-836.
  383. Vanaja, S. K., Rathinam, V. A., & Fitzgerald, K. A. (2015). Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology*, 25(5), 308-315.
  384. Vandanmagsar, B., Youm, Y. H., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., Ravussin, E., Stephens J. M., & Dixit, V. D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*, 17(2), 179.
  385. Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P. & Pritchard, K. A. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9220-9225.
  386. Vendrov, A. E., Vendrov, K. C., Smith, A., Yuan, J., Sumida, A., Robidoux, J., Runge, M. S., & Madamanchi, N. R. (2015). NOX4 NADPH oxidase-dependent mitochondrial oxidative stress in aging-associated cardiovascular disease. *Antioxidants & redox signaling*, 23(18), 1389-1409.
  387. Villalobos, L. A., Uryga, A., Romacho, T., Leivas, A., Sánchez-Ferrer, C. F., Erusalimsky, J. D., & Peiró, C. (2014). Visfatin/Nampt induces telomere damage and senescence in human endothelial cells. *International journal of cardiology*, 175(3), 573-575.
  388. Violi, F., & Pignatelli, P. (2015). Clinical application of NOX activity and other oxidative biomarkers in cardiovascular disease: a critical review. *Antioxidants & redox signaling*, 23(5), 514-532.
  389. von Heideman, A., Berglund, Å., Larsson, R., & Nygren, P. (2010). Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 65(6), 1165-1172.
  390. Wang, L., Manji, G. A., Grenier, J. M., Al-Garawi, A., Merriam, S., Lora, J. M., Geddes B. J., Briskin M., DiStefano P. S. & Bertin, J. (2002). PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF- $\kappa$ B and caspase-1-dependent cytokine processing. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29874-29880.
  391. Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in immunology*, 5, 614.
  392. Wang, P., & Miao, C. Y. (2015). NAMPT as a therapeutic target against stroke. *Trends in pharmacological sciences*, 36(12), 891-905.
  393. Wang, P., Xu, T. Y., Guan, Y. F., Su, D. F., Fan, G. R., & Miao, C. Y. (2008). Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovascular research*, 81(2), 370-380.
  394. Wang, S., Zhang, X., & Tan, L. (2016). Serum amyloid a promotes visfatin expression in macrophages. *BioMed research international*, 2016.
  395. Wang, T., Zhang, X., Bheda, P., Revollo, J. R., Imai, S. I., & Wolberger, C. (2006). Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD<sup>+</sup> biosynthetic enzyme. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(7), 661.
  396. Wang, X. Q., Wan, H. Q., Wei, X. J., Zhang, Y., & Qu, P. (2016). CLI-095 decreases atherosclerosis by modulating foam cell formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular medicine reports*, 14(1), 49-56.
  397. Wang, Y., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2005). Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men-. *The American journal of clinical nutrition*, 81(3), 555-563.
  398. Wassmann, S., Stumpf, M., Strehlow, K., Schmid, A., Schieffer, B., Böhm, M., & Nickenig, G. (2004). Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation research*, 94(4), 534-541.
  399. Watson, A., Nong, Z., Yin, H., O'neil, C., Fox, S., Balint, B., Guo, L., Chu, M. W., Gros, R., & Pickering, J. G. (2017). Nicotinamide phosphoribosyltransferase in smooth muscle



- cells maintains genome integrity, resists aortic medial degeneration, and is suppressed in human thoracic aortic aneurysm disease. *Circulation research*, 120(12), 1889-1902.
400. Watson, M., Roulston, A., Bélec, L., Billot, X., Marcellus, R., Bédard, D., Bernier, C., Branchaud, S., Chan, H., Dairi, K., Gilbert, K., Goulet, D., Gratton, M. O., Isakau, H., Jang, A., Khadir, A., Koch, E., Lavole, M., Lawless, M., Nguyen, M., Paquette, D., Turcotte, E., Berger, A., Mitchell, M., Shore, G. C. & Beauparlant, P. (2009). The small molecule GMX1778 is a potent inhibitor of NAD<sup>+</sup> biosynthesis: strategy for enhanced therapy in nicotinic acid phosphoribosyltransferase 1-deficient tumors. *Molecular and cellular biology*, 29(21), 5872-5888.
  401. Wheatcroft, S. B., Williams, I. L., Shah, A. M., & Kearney, M. T. (2003). Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabetic Medicine*, 20(4), 255-268.
  402. Wijnand, K., Cheng, C., Pasterkamp, G., & Duckers, H. J. (2010). Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis*, 209(2), 314-320.
  403. Witztum, J. L., & Lichtman, A. H. (2014). The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 73-102.
  404. Woollard, K. J. (2013). Immunological aspects of atherosclerosis. *Clinical Science*, 125(5), 221-235.
  405. Xia, M., Boini, K. M., Abais, J. M., Xu, M., Zhang, Y., & Li, P. L. (2014). Endothelial NLRP3 inflammasome activation and enhanced neointima formation in mice by adipokine visfatin. *The American journal of pathology*, 184(5), 1617-1628.
  406. Xie, H., Tang, S. Y., Luo, X. H., Huang, J., Cui, R. R., Yuan, L. Q., Zhou, H. D., Wu, X. P., & Liao, E. Y. (2007). Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcified tissue international*, 80(3), 201-210.
  407. Xin, R., Sun, X., Wang, Z., Yuan, W., Jiang, W., Wang, L., Xiang, Y., Zhang, H., Li, X., Hou, Y., Sun, W & Du, P. (2018). Apocynin inhibited NLRP3/XIAP signalling to alleviate renal fibrotic injury in rat diabetic nephropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1325-1331.
  408. Yamaguchi, S., & Yoshino, J. (2017). Adipose tissue NAD<sup>+</sup> biology in obesity and insulin resistance: from mechanism to therapy. *Bioessays*, 39(5), 1600227.
  409. Yang, H., Roberts, L. J., Shi, M. J., Zhou, L. C., Ballard, B. R., Richardson, A., & Guo, Z. M. (2004). Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circulation research*, 95(11), 1075-1081.
  410. Yang, J., Huang, C., Yang, J., Jiang, H., & Ding, J. (2010). Statins attenuate high mobility group box-1 protein induced vascular endothelial activation: a key role for TLR4/NF-κB signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 345(1-2), 189-195.
  411. Yang, T., Chan, N. Y. K., & Sauve, A. A. (2007). Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. *Journal of medicinal chemistry*, 50(26), 6458-6461.
  412. Yang, Y., Ju, D., Zhang, M., & Yang, G. (2008). Interleukin-6 stimulates lipolysis in porcine adipocytes. *Endocrine*, 33(3), 261-269.
  413. Yazar, M., Deger, Y., & Yur, F. (2011). Serum cytokine and vitamin E levels in experimental diabetic rats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 622-626.
  414. Ye, X., Zuo, D., Yu, L., Zhang, L., Tang, J., Cui, C., Bao, L., Zan, K., Zhang, Z., Yang, X., Chen, H., Tang, H., Zu, J., Shi, H., & Cui, G. (2017). ROS/TXNIP pathway contributes to thrombin induced NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis in microglia. *Biochemical and biophysical research communications*, 485(2), 499-505.
  415. Yilmaz, M. I., Saglam, M., Qureshi, A. R., Carrero, J. J., Caglar, K., Eyileten, T., ... & Yenicesu, M. (2008). Endothelial dysfunction in type-2 diabetics with early diabetic nephropathy is associated with low circulating adiponectin. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(5), 1621-1627.
  416. Yoon, M. J., Yoshida, M., Johnson, S., Takikawa, A., Usui, I., Tobe, K., Nakagawa, T., Yoshino, J., & Imai, S. I. (2015). SIRT1-mediated eNAMPT secretion from adipose tissue regulates hypothalamic NAD<sup>+</sup> and function in mice. *Cell metabolism*, 21(5), 706-717.
  417. Zamporlini, F., Ruggieri, S., Mazzola, F., Amici, A., Orsomando, G., & Raffaelli, N. (2014). Novel assay for simultaneous measurement of pyridine mononucleotides synthesizing activities allows dissection of the NAD<sup>+</sup> biosynthetic machinery in mammalian cells. *The FEBS journal*, 281(22), 5104-5119.

418. Zeyda, M., & Stulnig, T. M. (2009). Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review. *Gerontology*, 55(4), 379-386.
419. Zhai, Y., Meng, X., Ye, T., Xie, W., Sun, G., & Sun, X. (2018). Inhibiting the NLRP3 Inflammasome Activation with MCC950 Ameliorates Diabetic Encephalopathy in db/db Mice. *Molecules*, 23(3), 522.
420. Zhang, H., & Sun, S. C. (2015). NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell & bioscience*, 5(1), 63.
421. Zhang, J., Xia, L., Zhang, F., Zhu, D., Xin, C., Wang, H., Zhang, F., Guo, X., Lee, Y., Zhang, L., Wang, S., Guo, X., Huang, C., Gao, F., Liu, Y., & Tao, L. (2017). A novel mechanism of diabetic vascular endothelial dysfunction: Hypoadiponectinemia-induced NLRP3 inflammasome activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1556-1567.
422. Zhao, W. C., Zhang, B., Liao, M. J., Zhang, W. X., He, W. Y., Wang, H. B., & Yang, C. X. (2014). Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. *Neuroscience letters*, 560, 81-85.
423. Zhao, Y., Liu, X. Z., Tian, W. W., Guan, Y. F., Wang, P., & Miao, C. Y. (2014). Extracellular visfatin has nicotinamide phosphoribosyltransferase enzymatic activity and is neuroprotective against ischemic injury. *CNS neuroscience & therapeutics*, 20(6), 539-547.
424. Zheng, Y., Gardner, S. E., & Clarke, M. C. (2011). Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(12), 2781-2786.
425. Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S.R., McGeough, M.D., Ellisman, M. H., Seki, E., Gustafsson, A.B., Hoffman, H.M., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J. & Karin, M. (2016). NF-κB restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*, 164(5), 896-910.
426. Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2009). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*, 28, 445-489.
427. Zou, M. H., Shi, C., & Cohen, R. A. (2002). High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H2 receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes*, 51(1), 198-203.