

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA



NUEVOS MECANISMOS CELULARES IMPLICADOS EN LA
INFLAMACIÓN VASCULAR MEDIADA POR LA
INTERLEUQINA-1 β Y LA GLUCOSA:
PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 Y DE LAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES

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

ÁLVARO SAN HIPÓLITO LUENGO

Directores

Dra. Concepción Peiró Vallejo

Catedrática de Farmacología de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Carlos Sánchez Ferrer

Catedrático de Farmacología de la Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2021

“Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía. Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia”

Este trabajo ha sido subvencionado con la ayuda para proyectos I +D+ I del programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de I+D+I (SAF2014-52762-R; SAF2017-84776-R) y mediante la concesión de un contrato predoctoral para formación de personal investigador 2016 (FPI-UAM) por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (SFPI/2016-00981).

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
Diabetes mellitus: una enfermedad pandémica	15
1. Definición y prevalencia de la diabetes mellitus (DM)	15
2. Tipos de diabetes	16
2.1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)	16
2.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	17
2.3. Otros tipos de diabetes	19
Complicaciones vasculares de la DM	20
1. Macrovasculopatía diabética	21
2. Microvasculopatía diabética	22
3. Mecanismos fisiopatológicos de la vasculopatía diabética: papel de la hiperglucemia	23
3.1. AGEs	24
3.2. ROS	25
3.3. Objeciones a la teoría de Brownlee	26
Inflamación	27
1. La DM como enfermedad inflamatoria	27
2. Inflamación, obesidad y resistencia a la insulina	28
3. Inflamación y enfermedad vascular	29
3.1. Disfunción endotelial e inflamación	29
3.2. Aterosclerosis e inflamación	30
3.3. Envejecimiento vascular prematuro e inflamación. “ <i>Inflammaging</i> ”	32
Interleuquina (IL)-1β	35
1. ILs: familia IL-1	35
2. Biogénesis, secreción y mecanismo de acción de la IL-1 β	35
3. IL-1 β , DM y obesidad	37
4. IL- β y vasculopatía diabética	38
5. Bloqueo farmacológico de la IL-1 β	40

Inflamasoma NLRP3.....	45
1. Los inflamasomas.....	45
2. El inflamasoma NLRP3	47
3. Inflamasoma NLRP3, obesidad y diabetes	49
4. Inflamasoma NLRP3 y vasculopatía diabética.....	51
Vesículas Extracelulares.....	54
1. Tipos de vesículas extracelulares	54
1.1. Vesículas de gran tamaño o microvesículas (IEVs)	54
1.2. Vesículas de pequeño tamaño o exosomas (sEVs).....	57
2. Vesículas extracelulares, obesidad, y diabetes	60
3. Vesículas extracelulares y vasculopatía diabética.....	61
4. Vesículas extracelulares, NLRP3 e IL-1 β	64
OBJETIVOS.....	67
Objetivos específicos	69
Materiales y métodos.....	71
Obtención de cultivos celulares.....	73
1. Células de músculo liso vascular de aorta humano (CMLVH).....	73
Western Blot.....	74
1. Extracción de las muestras	75
2. Determinación de la concentración proteica por el método del BCA.....	75
3. Electroforesis y transferencia	76
4. Bloqueo e incubación con anticuerpos.....	76
5. Detección de la proteína de interés.....	79
Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal	80
1. Visualización de agregados de ASC mediante microscopía confocal	80
Aislamiento de vesículas extracelulares de CMLVH	82
1. Aislamiento de vesículas de gran tamaño (IEVs) o microvesículas.....	82
2. Aislamiento de vesículas de pequeño tamaño (sEVs) o exosomas	83

Caracterización de las EVs de CMLVH	84
1. Citometría de flujo	84
2. Análisis de seguimiento de nanopartículas “ <i>nanotracking</i> ”	86
3. Western Blot	87
Materiales	88
Análisis estadístico	89
RESULTADOS.....	91
PARTE I.....	93
1. La IL-1 β induce la expresión de iNOS y la activación de NF- κ B en CMLVH: potenciación por D-glucosa a elevadas concentraciones	93
2. La IL-1 β induce la fase de cebado del inflamasoma NLRP3 que se potencia en alta glucosa	95
3. La IL-1 β induce la fase de activación del inflamasoma NLRP3 que se potencia en alta glucosa	95
4. La NADPH oxidasa interviene en el proceso de activación del inflamasoma NLRP3 y su potenciación en alta glucosa	100
PARTE II.....	102
1. La IL-1 β induce un cambio metabólico en las CMLVH incrementándose los niveles de PKM2 y HIF-1 α , que se potencian en alta glucosa	102
2. La IL-1 β induce la secreción de IEVs en CMLVH que se potencia en alta glucosa	104
3. La IL-1 β induce la secreción de sEVs en CMLVH que se potencia en alta glucosa ...	106
4. La IL-1 β induce una reducción del tamaño de las sEVs que se potencia en alta glucosa	107
5. La IL-1 β induce la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 en contenido de las IEVs de CMLVH, que se potencia en alta glucosa	110
6. La IL-1 β induce la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 en contenido de las sEVs de CMLVH, que se potencia en alta glucosa	111
PARTE III.....	113
1. Anakinra previene la activación de NF- κ B ejercida por la IL-1 β , y su potenciación en alta glucosa	113
2. Anakinra previene la activación del inflamasoma NLRP3 ejercida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa	115
3. Anakinra previene la expresión de PKM2 en CMLVH inducida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa	119

4. Anakinra previene la producción de IEVs en CMLVH inducida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa	121
5. Anakinra previene la producción de sEVs en CMLVH inducida por la IL-1 β , y su potenciación en alta glucosa	121
6. Anakinra previene la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 en el contenido de las EVs de CMLVH y su potenciación en alta glucosa	124
PARTE IV	126
1. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1 β y/o alta glucosa inducen la expresión de iNOS y NLRP3 en CMLVH	126
2. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1 β y/o alta glucosa inducen la formación del <i>speck</i> de ASC en CMLVH	127
RESUMEN	131
<i>DISCUSIÓN</i>	133
<i>CONCLUSIONES</i>	149
<i>CONCLUSIONS</i>	153
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	157

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad epidémica que está considerada como un importante factor independiente de riesgo cardiovascular. En efecto, las enfermedades cardiovasculares (CVD) representan la mayor causa de morbimortalidad en estos pacientes. Se ha apuntado a la hiperglucemia como un causante principal de enfermedad vascular en DM. Sin embargo, el estricto control de la glucemia no ha conseguido evitar la aparición de CVD. Actualmente, la diabetes está considerada como una enfermedad inflamatoria, caracterizada por la presencia de elevados niveles de mediadores inflamatorios, entre los que destaca la interleuquina (IL)-1 β , cuya implicación en el desarrollo de CVD asociadas a la DM, ha sido recientemente demostrada en una serie de ensayos clínicos.

En el presente trabajo, se estudiaron en primer lugar los mecanismos, a través de los cuales, la IL-1 β induce inflamación en cultivos de células de músculo liso vascular humano (CMLVH), y su modulación por elevadas concentraciones de glucosa extracelular. Nos centramos en el estudio del inflamasoma NLRP3, complejo de la inmunidad innata que produce la forma activa de la IL-1 β . La glucosa potenció la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la IL-1 β en las CMLVH, resultando en una mayor producción de la propia IL-1 β madura, sin que este incremento de la glucosa indujese cambios por sí mismo en la activación de este complejo inmune. Por otra parte, ahondando en los mecanismos celulares inducidos por la IL-1 β en las CMLVH, se estudió la capacidad de la citoquina para modificar el patrón secretor de vesículas extracelulares (EVs) liberadas por estas células. La IL-1 β indujo un incremento en la secreción de ambos tipos de EVs, tanto de gran tamaño (IEVs), como de pequeño tamaño (sEVs), e indujo la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3, incluida la propia IL-1 β madura, en el interior de ambas poblaciones. Además, la glucosa potenció este efecto prosecretor de la IL-1 β sobre las CMLVH, así como la presencia de los componentes asociados al inflamasoma NLRP3 en su interior. Por último, se comprobó mediante bioensayo que las IEVs procedentes de CMLVH expuestas a IL-1 β fueron capaces de producir una respuesta inflamatoria en CMLVH testigo no tratadas. Esta respuesta fue muy superior cuando las IEVs procedían de células expuestas a la IL-1 β y a altas concentraciones de glucosa, lo que destaca el papel de las EVs como posibles mediadores inflamatorios en la comunicación intercelular.

Además, y con el objetivo de analizar posibles abordajes terapéuticos se estudió el papel del fármaco biológico anakinra (AK), una proteína recombinante que bloquea el receptor de IL-1. AK no sólo fue capaz de impedir la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la IL-1 β en CMLVH, sino que además impidió su potenciación por elevadas concentraciones de glucosa. Asimismo, AK previno tanto la sobreproducción de EVs inducida por IL-1 β y su potenciación por alta glucosa, como la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 y de la IL-1 β madura en su interior.

En conjunto, la IL-1 β representa una potencial diana terapéutica para prevenir y/o tratar las complicaciones vasculares asociadas a la DM con nuevos fármacos ya aprobados como anakinra y el anticuerpo monoclonal canakinumab. Asimismo, el inflamasoma NLRP3 y el transporte de sus componentes, incluida la propia IL-1 β , en EVs emergen como nuevos mecanismos potenciales implicados en la inflamación vascular asociada a enfermedades metabólicas como la DM.

SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is an epidemic disease and is considered as an important independent cardiovascular risk factor. Indeed, cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of morbidity and mortality in diabetic patients. Hyperglycemia has been suggested as the main cause of diabetes associated CVD. However, the tight control of glycemia has not reduced or prevented the occurrence of CVD. Nowadays diabetes is considered as an inflammatory disease featured by the presence of increased levels of inflammatory agents, among which interleukin (IL)-1 β highlights, whose involvement in diabetes physiopathology and its associated CVD has been proved by several clinical studies.

In this work, firstly, molecular mechanisms of IL-1 β -induced inflammation were studied in human aortic smooth muscle cell cultures (HASMC), and its modulation by high glucose extracellular concentration. We focused on the role of NLRP3 inflammasome, an innate immunity complex which produces the active form of IL-1 β . High glucose potentiated NLRP3 inflammasome activation elicited by IL-1 β in HASMC, inducing an increase of own mature IL-1 β production, by contrast, high glucose *per se* did not elicit any change in this immune complex. On the other hand, to delve into IL-1 β cellular mechanisms in HASMC, the ability of the cytokine to modify the secretory pattern of extracellular vesicles (EVs) produced by HASMC was analyzed. IL-1 β induced an increased secretion of both EVs populations, large vesicles (IEVs) and small vesicles (sEVs) and induced the presence of NLRP3 inflammasome components, even the mature form of IL-1 β , in the cargo of both EVs populations. Besides, high glucose exacerbated these prosecretory effect of IL-1 β on HASMC, as much as the presence of NLRP3 inflammasome associated components inside both EVs populations. Finally, the ability to induce an inflammatory response of IEVs from HASMCs treated with IL-1 β was assessed by bioassay over non treated HASMCs. This response was much higher when IEVs were from HASMCs treated with IL-1 β and high glucose concentration, what highlights the role of EVs as possible inflammatory mediators in intercellular communication.

Besides, and with the objective to analyze a potential therapeutic approach for this inflammation, the biological drug anakinra (AK), a recombinant protein which blocks IL-1 receptor, was studied. AK was able to prevent not only the activation of NLRP3 inflammasome, but also its exacerbation by high glucose concentration in HASMC. In addition, AK prevented the overproduction of both populations of EVs elicited by IL-1 β and its exacerbation in high glucose concentration, as well as the presence of NLRP3 inflammasome components and the mature form of IL-1 β inside these EVs.

In general terms, IL-1 β represents itself a potential therapeutic target to prevent or delay vascular complications in DM with new approved drugs, such as anakinra and monoclonal antibody canakinumab. In addition, NLRP3 inflammasome activation and the transport of its components, IL-1 β included, in EVs emerge as new potential mechanisms involved in vascular inflammation associated to metabolic disease, such as DM.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico	CVD: enfermedades cardiovasculares
AGEs: Productos finales de glicosilación avanzada	DAMP: patrones moleculares asociados a daño
AK: anakinra	DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilidol 2-HCL
ALIX: proteína X de interacción con ALG	DCCT: Diabetes Control and Clinical Complications Trial
ANOVA: análisis de la varianza	DE: disfunción endotelial
AP-1: proteína activadora 1	DM: diabetes mellitus
Apo: apocinina	DM1: diabetes mellitus tipo 1
ARN: ácido ribonucleico	DM2: diabetes mellitus tipo 2
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco
ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain	DMG: diabetes mellitus gestacional
BCA: ácido bicincónico	EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
BSA: albúmina sérica bovina	EEM: error estándar de la media
CANTOS: Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study	eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial constitutiva
CARD: dominio de reclutamiento de caspasa	ERK 1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2
CEIC: comité ético de investigación clínica	ESCRT: complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte
CMLVH: células de músculo liso vascular humano	EVA: envejecimiento vascular prematuro
CO₂: dióxido de carbono	EVs: vesículas extracelulares

Abreviaturas

FCS: suero fetal bovino

FID: Federación Internacional de Diabetes

FITC: isocianato de fluoresceína

GLUT: transportador de glucosa

GTP: guanosín trifosfato

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HIF1 α : factor inducible por hipoxia-1 α

HRP: peroxidasa de rábano

hsPCR: proteína C reactiva de alta sensibilidad

IAM: infarto agudo de miocardio

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular

IF: inmunofluorescencia indirecta

IL: interleuquina

IL-1R1: receptor 1 de IL-1

IL-1Ra: antagonista del receptor de IL-1

iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible

IRAK: quinasa asociada al receptor de IL-1

JNK: quinasas terminales c-Jun

kDa: kilodalton

LDL: lipoproteína de baja densidad

IEVs: vesículas extracelulares de gran tamaño

LPS: lipopolisacárido

LRR: dominio rico en repeticiones de leucina

MAPK: quinasas activadas por mitógenos

MCC 950: sal de sodio Cp-456773

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

miARN: micro ARN

MVB: cuerpo multivesicular

MYD88: factor de diferenciación mieloide 88

NaCl: cloruro sódico

NADPH: dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato

ND: nefropatía diabética

NF- κ B: factor nuclear κ de transcripción

NLR: receptor tipo NOD

NLRP3: proteína 3 del receptor tipo NOD

NO: óxido nítrico

NOD: dominio de unión a nucleótidos

NOX: NADPH oxidasa

NRF2: factor nuclear derivado de eritroide 2

O₂: oxígeno molecular

O₂⁻: anión superóxido

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PCR: proteína C reactiva

PKC: proteína quinasa C

PKM2: isoforma 2 de la piruvato quinasa

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PVDF: fluoruro de polivinilideno

PYD: dominio de pirina

RAGE: receptor de AGE

RD: retinopatía diabética

ROCKI: quinasas asociadas a Rho

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPM: revoluciones por minuto

RT: temperatura ambiente

SDS: dodecil sulfato sódico

sEVs: vesículas extracelulares de pequeño tamaño

TBS-T: tampón salino de tris y tween

TLR: receptores tipo Toll

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TRAF6: factor asociado al receptor de TNF6

TSG101: proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study

VAMP7: proteína de membrana asociada a vesículas 7

VCAM-1: moléculas de adhesión vascular de tipo 1

vSNARE: proteínas vesiculares de fijación soluble del factor sensible a SNF

WB: western blot

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS: UNA ENFERMEDAD PANDÉMICA

1. Definición y prevalencia de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un desorden cardiometabólico que se caracteriza por la presencia continuada de elevados niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia. Esto puede deberse a una disminución o ausencia en la secreción de la hormona insulina, o bien a defectos en su mecanismo de acción, dando lugar a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (American Diabetes Association, 2013). Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa, además de una mayor susceptibilidad a sufrir infecciones. Las manifestaciones metabólicas más agudas incluyen la cetoacidosis o el síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico, el cual, si no se controla puede provocar deshidratación, entrada en coma, o la muerte (American Diabetes Association, 2013).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la prevalencia global de la DM se ha incrementado notablemente en las recientes décadas, por lo que se ha declarado como enfermedad epidémica. En el año 2019 se calcula que 463 millones de personas entre 20 y 79 años padecían DM en todo el mundo (Fig. 1). Sin embargo, estas cifras no dejan de crecer, y se prevé que para el año 2030 y 2045 las cifras aumenten hasta los 578,4 y 700,2 millones de afectados, respectivamente (Saeedi *et al.*, 2019). Este drástico incremento de la prevalencia afecta a todos los países independientemente de su situación geográfica. Los países con mayor poder económico presentan una mayor prevalencia, lo que refleja que el estilo de vida de países más desarrollados en los que el sedentarismo, el incremento en la prevalencia de la obesidad, el tabaquismo y la ausencia de actividad física, contribuyen drásticamente a la aparición de DM. Además, la prevalencia de la DM establece una correlación positiva con la edad, dándose un aumento significativo de diabetes en sociedades envejecidas. De

hecho, se estima que la incidencia entre adultos por encima de los 65 años es de 135,6 millones de personas (19,3%) (Saeedi *et al.*, 2019).

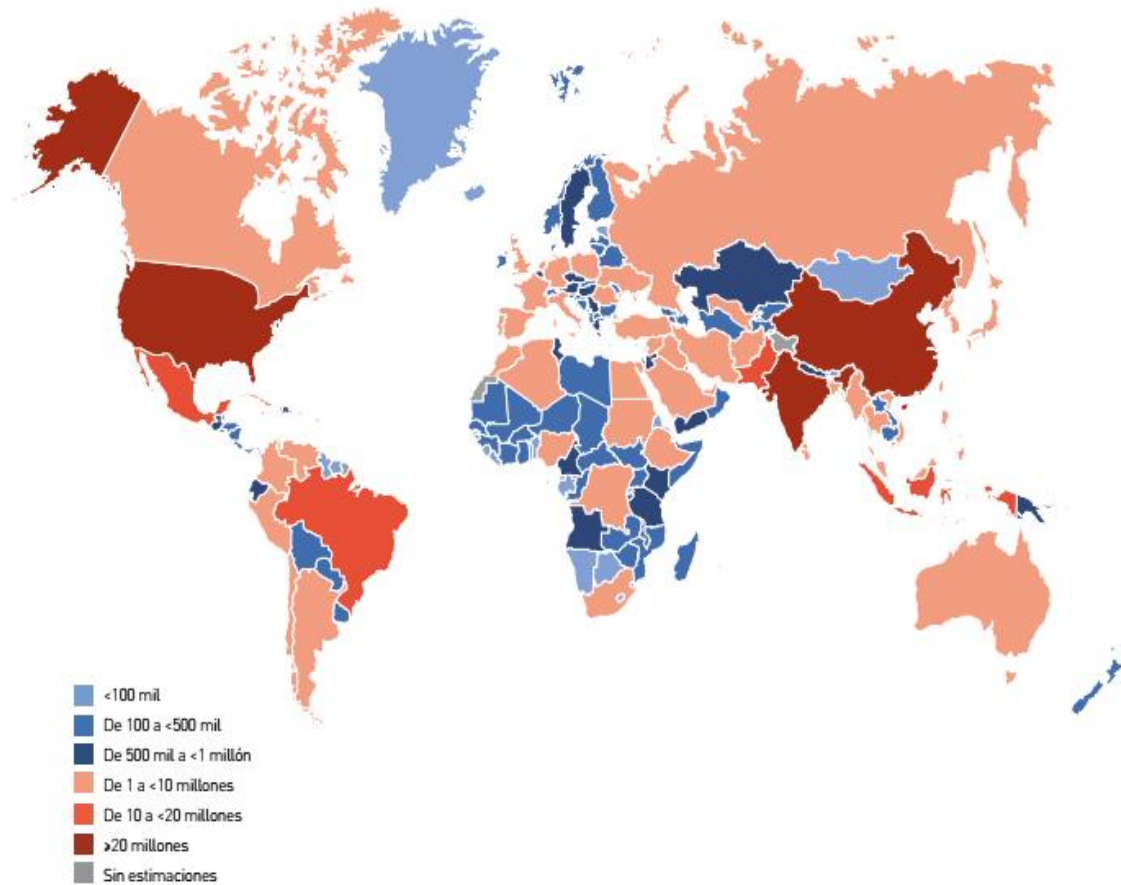


Figura 1. Número total de adultos (entre 20-79 años) con DM en 2019. (Atlas de la diabetes, Federación Internacional de Diabetes (FID), 2019).

2. Tipos de diabetes

2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), conocida también como diabetes insulino dependiente o diabetes juvenil representa en torno al 5-10% de los casos de diabetes. Está caracterizada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas (Chatenoud *et al.*, 2012), lo que produce una deficiencia de insulina. Por ello, la necesidad de un suministro exógeno de insulina es crucial para un

correcto funcionamiento metabólico en los pacientes afectados. Algunos biomarcadores de esta acción autoinmune son anticuerpos frente a diferentes proteínas o autoantígenos presentes en las células β pancreáticas, como los antígenos de células insulares, las tirosina fosfatasa (IA-2 e IA-2 β) y el antígeno de la glutamato descarboxilasa pancreática (GAD65). Alguno o varios de estos anticuerpos están presentes en el 85-90% de los pacientes a los que se les detecta hiperglucemia en ayunas. Sin embargo, en este tipo de diabetes no todos los pacientes presentan el mismo grado de destrucción de células β , algunos mantienen una actividad residual suficiente para prevenir los síntomas durante años.

Esta destrucción autoinmune está predispuesta por múltiples factores genéticos, pero también intervienen algunos factores ambientales, cuya aportación aún se está estudiando (American Diabetes Association, 2013). La mayoría de estos casos de DM1 se atribuyen a esta reacción autoinmune frente a las células β (diabetes tipo 1a), pero una minoría de ellos es debida a una destrucción idiopática o a un funcionamiento defectuoso de las células β (diabetes idiopática o tipo 1b), en la que existe una fuerte predisposición genética y no hay evidencias de una destrucción autoinmune. Estos pacientes presentan periodos con diferentes grados de insulinodeficiencia, por lo que suele ser necesario un suministro intermitente de insulina exógena (American Diabetes Association, 2013).

La prevalencia e incidencia global real de la DM1 continúa siendo desconocida, pero según datos de la OMS se estima un incremento del 3-4% respecto a los niveles actuales en la incidencia de esta enfermedad en la infancia, siendo el tipo de DM más común entre niños y adolescentes (Patterson *et al.*, 2019).

2.2 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), conocida también como diabetes no-insulinodependiente, comprende el 90-95% de todos los casos de DM. Esta enfermedad cursa con una relativa deficiencia en la producción de insulina y alteraciones en la tolerancia a la glucosa debida a la resistencia de algunos

tejidos periféricos a la insulina. La consecuencia es una mayor producción de insulina por parte del páncreas para tratar de compensar la resistencia a la insulina generando hiperinsulinemia. En la DM2, los síntomas como la cetoacidosis raramente aparecen de manera espontánea, suelen aparecer asociados a otra enfermedad, o se ponen de manifiesto con otras enfermedades como infecciones, o por la acción de diversos fármacos. Por ello, este tipo de diabetes suele permanecer sin diagnóstico durante los primeros años, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, y a menudo el paciente no identifica los síntomas clásicos de la DM (American Diabetes Association, 2019).

Estos pacientes no suelen necesitar necesariamente un tratamiento exógeno de insulina durante su vida puesto que no se produce una destrucción de las células β pancreáticas temprana, sino que ocurre de forma gradual en el tiempo. Existen diversas causas de este tipo de DM, sin embargo, aún no se conoce una etiología específica (American Diabetes Association, 2019). La mayoría de estos pacientes presentan obesidad o sobrepeso, la cual está fuertemente asociada a un cierto grado de resistencia a la insulina. Además, la DM2 se ha observado en otros pacientes que no alcanzan el criterio de obesidad o sobrepeso, pero que presentan un mayor índice de grasa corporal distribuida principalmente en la región abdominal (tejido adiposo visceral). De hecho, la estrecha relación entre la obesidad y la DM2 llevó a acuñar el término “diabesidad” a principios de los años 70 por Sims *et al.* para definir la coexistencia de ambas patologías (Sims *et al.*, 1973). Esta coexistencia de ambas patologías está declarada como enfermedad pandémica por la OMS.

Diversos factores ambientales incrementan el riesgo de aparición de la DM2, entre ellos destacan la edad, la obesidad o el sobrepeso, la inactividad física y un estilo de vida sedentario. Suele aparecer también con mayor propensión en mujeres que han padecido diabetes mellitus gestacional durante el embarazo. Además, prevalece en determinados grupos raciales o diferentes etnias, como en sectores de ascendencia asiática y afroamericana. Por último, la DM2 presenta una fuerte predisposición genética, lo que aumenta las probabilidades de padecerla si hay un historial familiar de DM2 (Swen *et al.*, 2011).

2.3 Otros tipos de diabetes

La OMS y la FID indican la existencia de otros tipos específicos de diabetes que se clasifican según su etiología. Entre ellos destacan, la diabetes mellitus gestacional (DMG) o diabetes en el embarazo. En ambos casos, se produce un desorden metabólico asociado a serias complicaciones prenatales, como hiperinsulinemia e hipoglucemia en el parto, así como el riesgo de malformaciones fetales. La diabetes incrementa el riesgo de mortalidad tanto para el feto o neonato, como para la madre (American Diabetes Association, 2013; Guariguata *et al.*, 2014). Otros tipos de diabetes se producen por defectos genéticos en la acción de la insulina o en las células β pancreáticas, estos últimos suponen entre el 1,5% y el 2% de los casos globales de DM. Algunos tipos se corresponden con desórdenes pancreáticos, como la pancreatitis, el cáncer de páncreas, o bien por endocrinopatías caracterizadas por un desequilibrio hormonal. Sin embargo, existen otros tipos de diabetes inducidas por agentes externos como infecciones víricas del tipo citomegalovirus, adenovirus o virus coxsackie, o bien inducidas por fármacos o químicos (American Diabetes Association, 2013).

COMPLICACIONES VASCULARES DE LA DM

Las complicaciones cardiovasculares de la DM representan la mayor causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos. En pacientes con DM2 el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (CVD) es mucho mayor, e incluso comienza en fases tempranas de la prediabetes relacionándose con la resistencia a la insulina, o una peor tolerancia a la glucosa. La hiperglucemia crónica y la resistencia a la insulina juegan un papel protagonista en la iniciación de las complicaciones vasculares en la que intervienen diferentes mecanismos, incluyendo la disfunción endotelial (DE), la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs en inglés) y la activación de su receptor (RAGE), el estrés oxidativo, y la inflamación (Petrie *et al.*, 2018). Estas complicaciones se han dividido tradicionalmente en dos grupos: macrovasculares (afectan a las arterias de mayor tamaño) y microvasculares (afectan a capilares y arterias de menor tamaño) (Fig. 2).

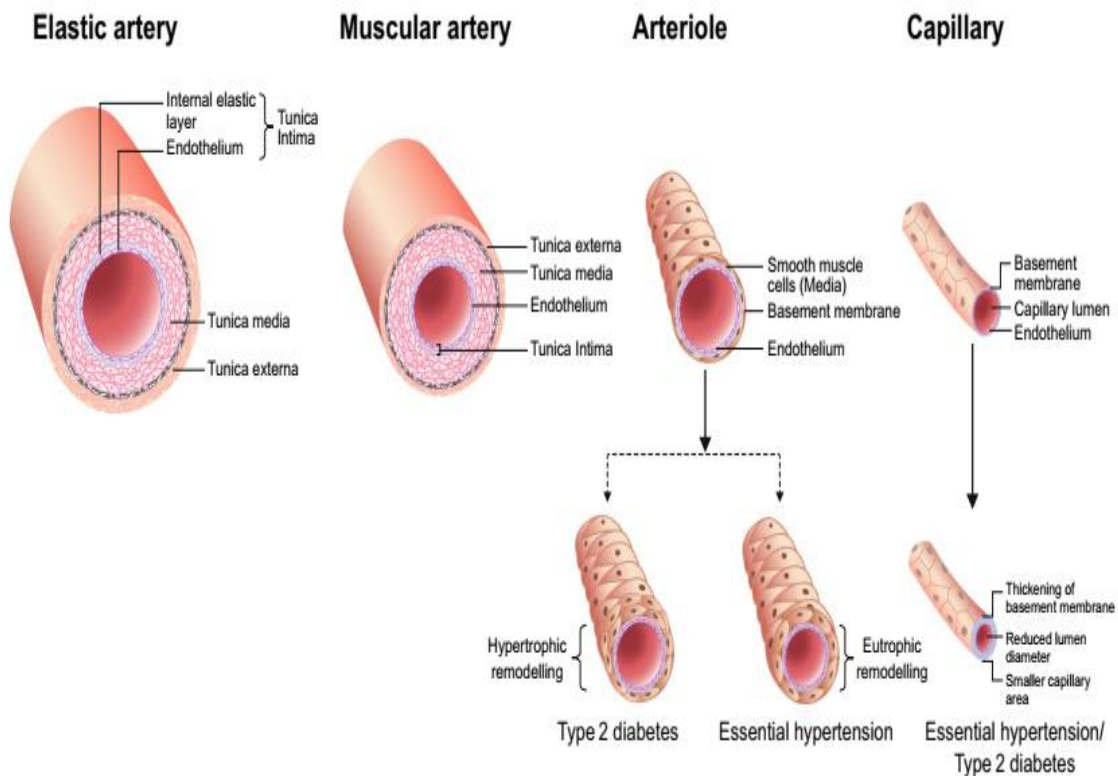


Figura 2. Jerarquía vascular y cambios estructurales en condiciones de diabetes e hipertensión (Strain y Paldánus, 2018).

Las complicaciones microvasculares comprenden la retinopatía diabética, la nefropatía y neuropatía, mientras que entre las complicaciones macrovasculares están la aterosclerosis y sus consecuencias como el infarto agudo de miocardio (IAM), cardiopatía isquémica prematura, accidentes cerebrovasculares y la enfermedad arterial periférica (Cooper *et al.*, 2001).

1. Macrovasculopatía diabética

Las complicaciones macrovasculares asociadas a la diabetes están asociadas con cambios funcionales y estructurales de grandes arterias (coronarias, carótida, aorta y arterias de miembros inferiores) que generan un aumento de la rigidez arterial, una velocidad de pulso anormal y una hipertensión sistólica (Rahman *et al.*, 2007). Todos estos fenómenos comprenden un complejo proceso inflamatorio que conduce finalmente a la aparición de IAM, y a la enfermedad arterial periférica. El principal proceso patológico asociado a la macrovasculopatía diabética es la aterosclerosis, cuya aparición se encuentra altamente acelerada en pacientes diabéticos, debido a distintos agentes como la hiperglucemia, la glucooxidación, los elevados niveles de lipoproteínas, mediadores inflamatorios y protrombóticos, así como un aumento del tejido adiposo visceral (Subramanian y Hirsch, 2018). Todos estos factores metabólicos y proinflamatorios llevan a la aparición de la DE y a una disfunción del músculo liso vascular de los grandes vasos (Petrie *et al.*, 2018).

La DE es uno de los principales precedentes del proceso aterosclerótico y de los cambios estructurales y funcionales que ocurren durante la vasculopatía diabética. La DE se caracteriza por una alteración en la homeostasis fisiológica entre los factores vasoconstrictores (endotelina-1 o angiotensina II) y vasodilatadores (óxido nítrico (NO) o prostaciclina) producidos por el endotelio. La DE implica una mayor permeabilidad celular lo que, junto a un ambiente proinflamatorio, genera una disfunción y una inflamación del músculo liso vascular de la capa media de los vasos (Rahman *et al.*, 2007; Tousoulis *et al.*, 2012).

La disfunción del músculo liso vascular se caracteriza por una hipertrofia de la capa media, además de una excesiva proliferación y migración de este tipo celular hacia la capa neoíntima de los vasos. Aquí va a generar un proceso de remodelado vascular produciéndose un desequilibrio entre las proteínas estructurales de los vasos (elastina y colágeno), que determinan la complianza y el tono vascular, y que por último, va a desarrollar una mayor rigidez arterial e hipertensión, las cuales son características de un envejecimiento vascular prematuro (EVA), y representan la antesala de la macrovasculopatía diabética (Cooper *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2007; Petrie *et al.*, 2018).

2. Microvasculopatía diabética

Las alteraciones en la microvasculatura afectan a pequeñas arterias de resistencia, arteriolas, capilares y vénulas, siendo la microangiopatía uno de los mecanismos más importantes que intervienen en el desarrollo tanto del daño orgánico, como en la aparición de eventos clínicos en pacientes diabéticos (Rizzoni y Rosei, 2009). La microangiopatía se ha descrito como el factor causante de complicaciones como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía diabéticas.

La retinopatía diabética (RD) es la complicación microvascular predominante en pacientes diabéticos, se encuentra fuertemente ligada a la hiperglucemia y es responsable de la aparición de 10.000 casos de ceguera al año en el mundo (Avogaro y Fadini, 2019). La pérdida de visión se asocia a la aparición del edema macular diabético, o bien a la formación de nuevos vasos sanguíneos y a un crecimiento del tejido fibroso (RD proliferativa), lo que finalmente genera un desprendimiento parcial de retina o hemorragia vítrea (Faselis *et al.*, 2020).

La nefropatía diabética (ND) afecta aproximadamente al 25% de la población diabética, siendo la mayor causa de enfermedad renal en etapa terminal (Faselis *et al.*, 2020). La ND se caracterizan por la presencia de proteinuria persistente (Deshpande *et al.*, 2008). La principal causa de esta complicación es la alteración del endotelio glomerular, lo que genera una pérdida

de la permeabilidad glomerular dando lugar a hiperfiltración y finalmente a la aparición de micro- y macroalbuminuria, las cuales, están fuertemente asociadas a la aparición y al desarrollo de CVD (Avogaro y Fadini, 2019).

La neuropatía diabética, es una alteración que se produce en las fibras nerviosas, y que afecta al 30-50% de la población diabética, puede manifestarse como mononeuritis o afectar al sistema nervioso autónomo o periférico. Se caracteriza por una pérdida de la sensibilidad, lo que aumenta la predisposición a la aparición de úlceras no dolorosas, las cuales desembocan en gangrena y la consecuente amputación de miembros inferiores. Otro tipo es la neuropatía autónoma, que provoca una alteración en el equilibrio simpático-parasimpático, el cual, predispone a la aparición de arritmias y casos de muerte súbita (Avogaro y Fadini, 2019).

Además de estas patologías, nuevos estudios sugieren también la implicación de la microvasculopatía diabética en la circulación coronaria e incluso sistémica. La microangiopatía se caracteriza por un aumento en crecimiento y en la filtración de pequeños vasos sanguíneos, lo que desarrolla edema local y una alteración en la función de los tejidos adyacentes. Todo ello, junto a diferentes mediadores como el estrés oxidativo y agentes proinflamatorios provocan una alteración de la microcirculación cardiaca (Haas y McDonnell, 2018).

3. Mecanismos fisiopatológicos de la vasculopatía diabética: papel de la hiperglucemia

Las complicaciones macrovasculares y microvasculares a menudo se desarrollan de manera simultánea, compartiendo algunos factores de riesgo y mecanismos fisiopatológicos como la DE y el remodelado vascular (Mohammedi *et al.*, 2017). En los últimos años, diferentes estudios se han centrado en cuatro mecanismos moleculares, a través de los cuales, la hiperglucemia podría generar daño en las células vasculares y producir cambios funcionales y estructurales. Estos mecanismos comprenden un incremento de flujo en la vía de los polioles, un incremento en la formación de AGEs, la activación de la

proteína quinasa C (PKC), así como un incremento de la actividad de la vía de las hexosaminas.

En 2001 Brownlee describió la unificación de estos mecanismos en una teoría (Brownlee, 2001), en la que se señala que la activación de las vías de los polioles y de la vía de la PKC conducen a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena respiratoria mitocondrial, y éstas favorecen a su vez la acumulación de AGEs intracelulares. Por ello, la formación de AGEs junto con la sobreproducción de estrés oxidativo se postulan como el mecanismo unificador a través del cual la hiperglucemia genera daño vascular (Henning, 2018) (Fig. 3).

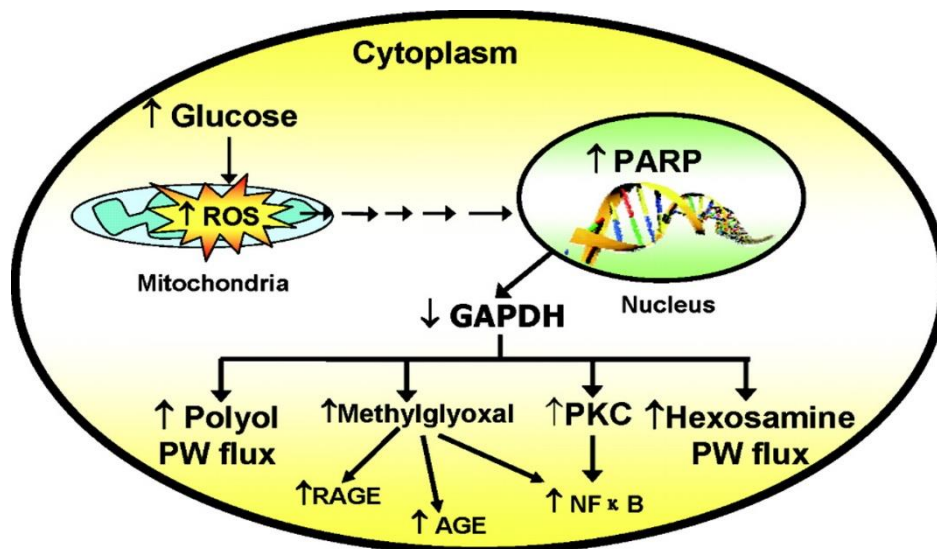


Figura 3. Teoría unificadora de Brownlee. Brownlee señaló que la activación de las vías de los polioles, la vía de la PKC, y la de las hexosaminas conducían a la sobreproducción de ROS y a la acumulación de AGEs intracelulares. Siendo ambos el mecanismo unificador, a través del cual, la hiperglucemia genera daño celular (Giacco y Brownlee, 2010).

3.1 AGEs

Los AGEs son compuestos que se forman mediante reacciones entre los ácidos nucleicos y proteínas con productos intermedios del metabolismo de azúcares. La hiperglucemia y el estrés oxidativo incrementan drásticamente su acumulación, lo que genera daño vascular alterando la función de proteínas

celulares, modificando los componentes de la matriz extracelular y mediante la unión a su receptor (RAGE). La vía de señalización AGE-RAGE activa además la vía del factor nuclear kappa B de transcripción (NF- κ B), las vías de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la activación de la dinucleótido de nicotinamina-adenina fosfato (NADPH) oxidasa (NOX), además de inducir la expresión de moléculas de adhesión, y de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL)-1 β , la IL-6 y el factor de crecimiento tumoral α (TNF- α). También se ha observado un incremento significativo de estas vías de señalización en el músculo liso vascular de pacientes diabéticos, las cuales, conducen a la aparición de fibrosis y calcificación vascular, así como a un aumento de la inflamación y de agentes protrombóticos que favorecen el desarrollo de la vasculopatía diabética y la aparición de CVD (Manigrasso *et al.*, 2013; Petrie *et al.*, 2018).

3.2 ROS

El estrés oxidativo parece ser un mecanismo clave de la glucotoxicidad en diabetes. Se ha observado que la hiperglucemia incrementa la generación de ROS, así como una acumulación de productos de oxidación lipídica, proteica y de ácidos nucleicos. El estrés oxidativo interactúa con el ADN y las proteínas, estimulando vías de señalización y produciendo modificaciones postraduccionales oxidativas que favorecen la inflamación, la fibrosis y el daño vascular. Además, la activación de las vías de los polioles y de la PKC citadas anteriormente contribuyen a retroalimentar positivamente la generación de estrés oxidativo. Una de las consecuencias del incremento del estrés oxidativo es la reducción de la biodisponibilidad del NO endotelial, característica fundamental de la DE. Otras de las principales causas de este incremento drástico del estrés oxidativo en pacientes diabéticos es la reducción en la capacidad antioxidante vascular, una reducción en la actividad del principal factor de transcripción antioxidante, el factor nuclear derivado de eritroide 2 (NRF2 en inglés), así como una activación de las diferentes isoformas de la NOX, principalmente las NOX-1, -4 y -5, y una alteración en el funcionamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Newsholme *et al.*, 2016; Petrie *et al.*, 2018).

3.3 *Objeciones a la teoría de Brownlee*

Estos mecanismos fisiopatológicos comparten la hipótesis principal de que la hiperglucemia es la causa principal de la vasculopatía diabética. Todo ello, ha conducido a que el tratamiento clásico y actual de la diabetes se haya centrado en el abordaje de la hiperglucemia con fármacos y medidas hipoglucemiantes. Sin embargo, en ensayos clínicos se ha demostrado que un control estricto de la glucemia no ha logrado prevenir las complicaciones vasculares, especialmente en grandes vasos. Entre ellos destacan los ensayos DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) y el UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) (UKPDS, 1998; Nathan, 2014). En este último, con una duración de 10 años, los resultados indicaron que un control intensivo de la glucemia lograba una reducción de la incidencia de las complicaciones microvasculares en pacientes diabéticos. Por el contrario, el control glucémico intensivo no consiguió reducir de manera significativa la tasa de mortalidad cardiovascular y la aparición de complicaciones macrovasculares tras 10 años de tratamiento (UKPDS, 1998; Haas y McDonnell, 2018).

Todos estos estudios coinciden finalmente en la hipótesis de que un control intensivo de la glucosa desde la fase temprana de la enfermedad reduciría y retrasaría la aparición de las complicaciones vasculares en estos pacientes. Sin embargo, los resultados indican que el control estricto de la glucemia no logra prevenir la aparición de estos eventos en el tiempo. Por ello, el abordaje terapéutico de la diabetes no debe centrarse exclusivamente en la reducción de la hiperglucemia. Nuevos estudios sugieren la existencia de otro mecanismo fisiopatológico clave en el desarrollo y aparición de las complicaciones vasculares, la inflamación.

INFLAMACIÓN

1. La DM como enfermedad inflamatoria

La relación entre la inflamación y la DM se remonta a los estudios de Ebstein en 1876 y de Williamson, 25 años más tarde, en los que ambos describieron que el tratamiento con el fármaco antiinflamatorio salicilato sódico disminuía la glucosuria en pacientes diabéticos. Ya en 1993, Hotamisilgil y su equipo, descubrieron que la citoquina proinflamatoria TNF α producida en el tejido adiposo era capaz de provocar resistencia a la insulina en modelos animales, a la vez que su bloqueo mejoraba la respuesta a la insulina (Lontchi-Yimagou *et al.*, 2013).

Durante las últimas décadas numerosos estudios han descrito la existencia de una correlación positiva entre la DM2 y la presencia de elevados niveles en sangre de proteínas inflamatorias de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno, la haptoglobina, el ácido siálico y el inhibidor del activador de plasminógeno, así como con niveles elevados de citoquinas y quimioquinas en estos pacientes. De hecho, la presencia de elevados niveles de IL-1 β , IL-6 y PCR son valores predictivos del desarrollo de la DM2 (Donath y Shoelson, 2011). Estas evidencias señalan que uno de los factores críticos de la DM2 es la inflamación crónica de bajo grado, recientemente denominada “metainflamación” y que posee un papel importante en el desarrollo de la propia enfermedad, así como en la aparición de las complicaciones vasculares asociadas a ella (Prattichizzo, 2017).

Muchas evidencias sugieren que la activación crónica de diferentes vías inflamatorias en las células sensibles a la insulina contribuye al desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina, y DM2. El estudio y caracterización de estas vías y mecanismos inflamatorios en el desarrollo de la DM2 puede revelar importantes dianas terapéuticas para mejorar la prevención y el control de la diabetes, así como sus complicaciones asociadas, incluidas las vasculares (Lontchi-Yimagou *et al.*, 2013).

2. Inflamación, obesidad y resistencia a la insulina

Como se ha indicado anteriormente, la obesidad es un factor de riesgo determinante para el desarrollo de DM2. La obesidad se debe, entre otros factores, a un desequilibrio entre la ingesta calórica y su consumo. Este exceso de nutrientes se ha relacionado con una posible activación del sistema inmune en aquellos órganos destinados a mantener la homeostasis energética, incluyendo el tejido adiposo, el páncreas, el hígado, músculo esquelético, el corazón y el cerebro, por lo que de ahí deriva el nombre de inflamación sistémica de bajo grado (Saltiel y Olefsky, 2017).

El tejido adiposo ya no es considerado un mero depósito energético, sino un verdadero órgano endocrino con una gran actividad secretora, en especial el tejido adiposo blanco visceral, el cual secreta una gran cantidad de moléculas denominadas adipoquinas, entre ellas destacan la adiponectina, la leptina, la visfatina, así como adipocitoquinas como el TNF α , IL-1 β , IL-6, y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). Durante el progreso y desarrollo de la obesidad se produce un crecimiento del tejido adiposo y de los adipocitos (hiperplasia e hipertrofia), el cual incrementa la expresión y la liberación de estas adipoquinas proinflamatorias (Das y Mukhopadhyay, 2011).

La hiperplasia o expansión del tejido adiposo se produce rápidamente, de manera que el tejido vascular no es capaz de suministrar suficiente oxígeno y nutrientes, y por ello el tejido adiposo entra en una situación de hipoxia. En esta situación se produce una gran liberación de adipoquinas y adipocitoquinas en los lugares de hipoxia o isquemia (Das y Mukhopadhyay, 2011). Esto incrementa el reclutamiento y la infiltración de células del sistema inmune hacia el tejido adiposo. Entre ellas destaca el papel de los macrófagos, presentando la mayoría de ellos un fenotipo M1, que se ha asociado a una menor sensibilidad a la insulina, favoreciendo la resistencia a esta hormona (Donath y Shoelson, 2011; van Greevenbroek *et al.*, 2013; Prasad *et al.*, 2020). Además, el incremento de la presencia de otras células del sistema inmune contribuye al mantenimiento del ambiente proinflamatorio (Cruz *et al.*, 2013).

Todas estas citoquinas y quimiocinas son liberadas al torrente sanguíneo induciendo una inflamación sistémica que promueve el desarrollo de la

resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, y la inflamación de la vasculatura, con la consiguiente aparición de DM2, y la aparición de DE y otras complicaciones vasculares, respectivamente (Shoelson, 2006).

3. Inflamación y enfermedad vascular

La DM está caracterizada por la presencia de una inflamación sistémica de bajo grado. A través de los mecanismos citados anteriormente se produce una sobreproducción de adipoquinas, como la visfatina y la leptina, y de citoquinas inflamatorias, como la IL-1 β , IL-6, TNF α , y MCP-1, en el tejido adiposo, hígado, y páncreas. Estos efectores inflamatorios van a distribuirse de manera sistémica a través de la circulación sanguínea afectando a diferentes órganos y tejidos, incluyendo a la propia vasculatura alterando su correcto funcionamiento.

3.1 Disfunción endotelial e inflamación

La DE está presente en pacientes diabéticos, tanto en DM1 como en DM2, y es un evento temprano que precede a la aparición de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Se caracteriza por la pérdida del equilibrio entre los factores endoteliales vasodilatadores y los factores vasoconstrictores. Este desequilibrio incrementa la formación de factores vasoconstrictores que favorecen la rigidez arterial y el desarrollo de CVD (Tousoulis *et al.*, 2012).

Numerosos estudios señalan diferentes mecanismos, a través de los cuales la inflamación desempeña un papel central en la disfunción endotelial. Estos incluyen, la acción de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias que activan diferentes vías metabólicas e inflamatorias, como el factor de transcripción NF- κ B, una mayor producción de estrés oxidativo, principalmente a través de la activación de la NOX, una menor producción y biodisponibilidad del NO, como consecuencia de alteraciones en las vías de activación de la eNOS, así como niveles elevados de AGEs, angiotensina II y ácidos grasos (Goldberg, 2009; Vallejo *et al.*, 2014; Peiró *et al.*, 2017).

Estos mecanismos inducen la activación de la célula endotelial, la cual experimenta cambios en su perfil de expresión. Estos cambios comprenden un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, una mayor secreción de selectina endotelial, así como una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias. Este fenómeno favorece la adhesión e infiltración de monocitos y células inmunes al endotelio, así como su diferenciación a macrófagos, los cuales van a retroalimentar este ambiente proinflamatorio (Ruotsalainen *et al.*, 2007; Imai *et al.*, 2013). Todo ello desencadena una alteración de la reactividad vascular, debida principalmente a factores vasoconstrictores e inflamatorios sobre el músculo liso vascular, lo que va a favorecer el desarrollo de una mayor rigidez arterial y finalmente la aparición de complicaciones vasculares como la hipertensión o la aterosclerosis (Goldberg, 2009; León-Pedroza *et al.*, 2015).

Además de la pérdida de la reactividad vascular, la disfunción endotelial favorece el desarrollo de un ambiente protrombótico con mayores niveles de expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), del factor tisular, así como una mayor activación plaquetaria. Estos contribuyen a la aparición de trombos, a un aumento de la hipertensión vascular y una mayor probabilidad de eventos cardiovasculares (Goldberg, 2009; Kakar y Lip, 2014).

3.2 Aterosclerosis e inflamación

En el siglo XIX, Virchow y Rokitansky ya describieron las primeras evidencias acerca del carácter inflamatorio del proceso aterosclerótico, indicando que la inflamación contribuía a la progresión de la lesión aterosclerótica. Aunque se consideró que los elevados niveles de colesterol en sangre, en particular las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y su acumulación en las paredes de los vasos eran el mayor factor de riesgo vascular, numerosos estudios epidemiológicos señalan la relación entre inflamación y el riesgo vascular. Además, la identificación de proteínas de fase aguda como marcadores predictivos de enfermedad vascular, como la PCR, y la identificación de citoquinas proinflamatorias en las lesiones ateroscleróticas han hecho que la aterosclerosis sea considerada hoy en día como una enfermedad inflamatoria crónica (Grebe *et al.*, 2018).

La diabetes se caracteriza por una mayor incidencia de aterosclerosis y una marcada dislipidemia, caracterizada por elevados niveles sanguíneos de colesterol LDL, y bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y una inflamación vascular crónica de bajo grado. La acumulación de colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos y de efectores proinflamatorios favorece la activación del endotelio y la disfunción endotelial a través de los mecanismos citados anteriormente. Durante este proceso, el endotelio presenta una mayor expresión de moléculas de adhesión, elevados niveles de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y MCP-1, que van a favorecer la adhesión y la migración de leucocitos y monocitos a la capa íntima y media (formada por el músculo liso vascular), donde al mismo tiempo, se produce una acumulación de LDL. Todos estos estímulos proinflamatorios favorecen la captación y absorción de lípidos por parte de monocitos, macrófagos e incluso del músculo liso vascular, transformándose a células espumosas, las cuales secretan citoquinas proinflamatorias y proteasas que degradan el colágeno de la matriz extracelular y contribuyen a la desestabilización de la placa de ateroma.

A su vez, la inflamación produce un cambio fenotípico sobre el músculo liso vascular, que sufre un proceso de diferenciación, incrementa su proliferación (hipertrofia de la capa media), y migra hacia la capa íntima. Además, en respuesta a este daño vascular el músculo liso vascular incrementa la síntesis de colágeno para estabilizar la placa aterosclerótica. De manera que existe un delgado equilibrio entre la síntesis y la degradación de colágeno. Todo este fenómeno conlleva un estrechamiento de la luz del vaso o estenosis, el cual, favorece la desestabilización de la placa fibrosa a través de factores hemodinámicos, que junto a factores inflamatorios favorecen la aparición de núcleos necróticos, inflamación vascular, y trombosis. Todo ello puede derivar en la rotura de la lesión aterosclerótica, la formación de trombos y hemorragias que pueden causar fatales consecuencias vasculares, como isquemia, infarto agudo de miocardio o accidente cerebrovascular (Fig. 4) (Shoelson, 2006; Taube *et al.*, 2012; Low Wang *et al.*, 2016).

Por todo ello, se destaca la importante implicación de la inflamación en el desarrollo de la aterosclerosis y la consecuente trombosis, las cuales son las

mayores responsables del desarrollo de la macrovasculopatía diabética (van Greevenbroek *et al.*, 2013).

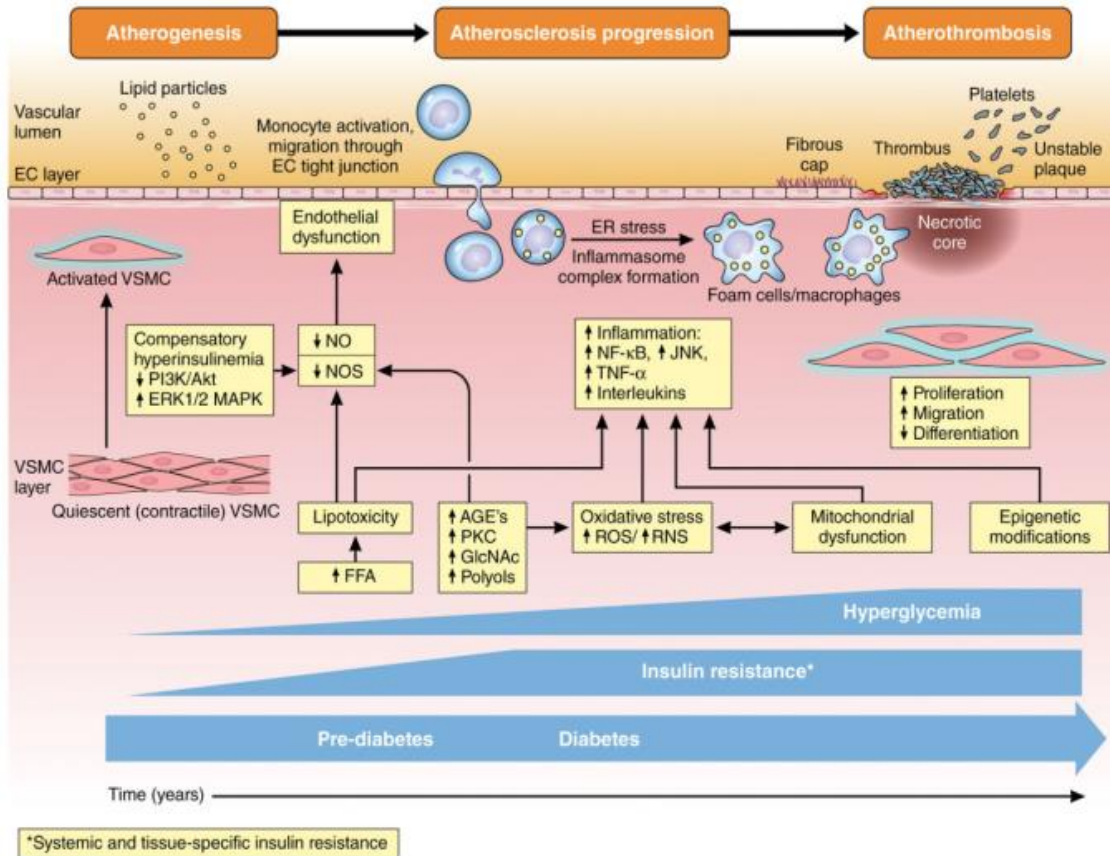


Figura 4. Mecanismos celulares y moleculares del desarrollo de la aterosclerosis en DM. Durante el desarrollo de la diabetes la hiperglucemia induce la acumulación de ROS y AGEs que resultan en la inflamación del endotelio y la DE, las cuales inducen la activación del músculo liso vascular promoviendo su proliferación y migración hacia la capa íntima de los vasos. Estos procesos, junto con la acumulación de LDL, la adhesión y acumulación de células del sistema inmune van a favorecer la aparición temprana de aterosclerosis en DM (Low Wang *et al.*, 2016).

3.3 Envejecimiento vascular prematuro e inflamación. “Inflammaging”

Otra de las manifestaciones vasculares asociadas a la inflamación en el contexto de la diabetes es la aparición y el desarrollo de un envejecimiento prematuro de los vasos sanguíneos (EVA). El envejecimiento vascular es un complejo proceso multifactorial que favorece alteraciones funcionales y estructurales en la vasculatura, favoreciendo la aparición de aterosclerosis y DE.

Estos efectos están determinados por diversos factores bioquímicos, como el estrés oxidativo y la inflamación crónica, los cuales pueden afectar tanto a la microcirculación como a grandes arterias. De hecho, el envejecimiento vascular es un factor predictor de fragilidad y de riesgo cardiovascular en la población envejecida. Más allá del proceso clásico de envejecimiento, la presencia de diabetes o hipertensión, entre otros factores de riesgo, acelera este proceso fisiológico dando lugar a la aparición temprana de estas alteraciones estructurales y funcionales (Guzik y Cosentino, 2018), que promueven una mayor rigidez arterial, favoreciendo el proceso aterosclerótico e incrementando la presión sanguínea. De hecho, la rigidez arterial es un factor determinante en la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Fig. 5) (Donato *et al.*, 2015; Maloberti *et al.*, 2019).

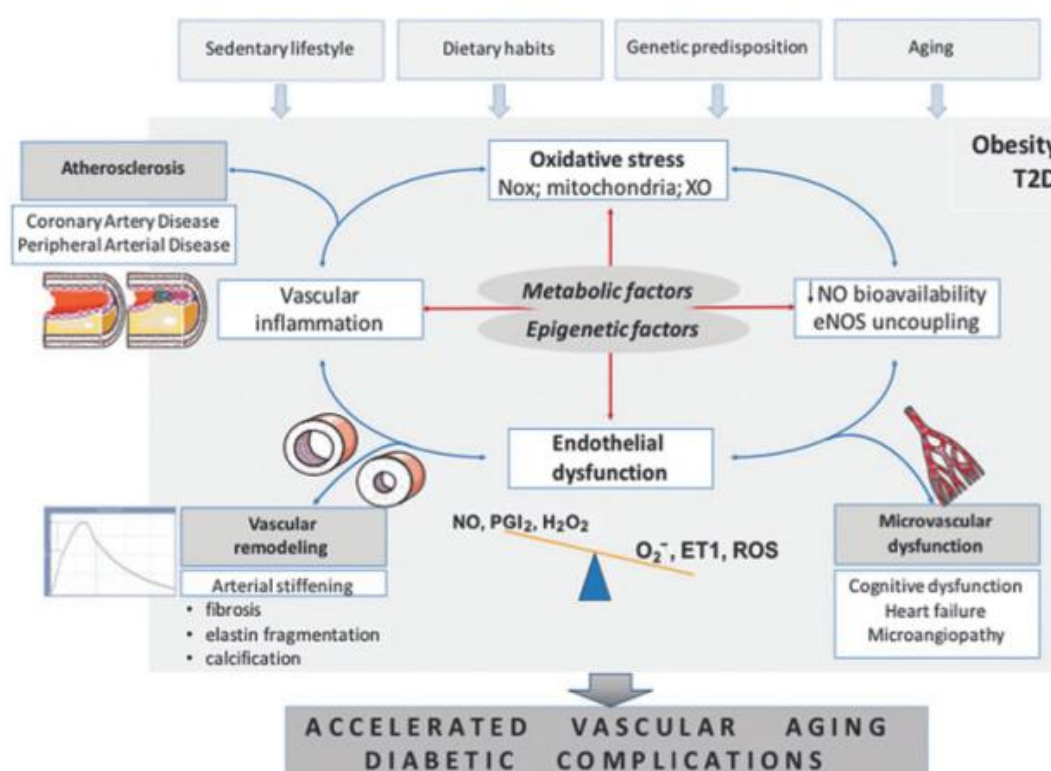


Figura 5. Mecanismos celulares y moleculares del desarrollo del envejecimiento vascular prematuro en DM. El EVA es un complejo proceso en el que intervienen numerosos factores ambientales como la dieta y el estilo de vida, factores genéticos, así como la presencia de enfermedades metabólicas como la DM2 y la obesidad. Todos ellos van a inducir la inflamación vascular, la acumulación de ROS, y finalmente la DE, favoreciendo el remodelado vascular y la aparición de aterosclerosis (Guzik y Cosentino, 2018).

En resumen, la diabetes, la obesidad y las complicaciones cardiovasculares asociadas, como la resistencia a la insulina, la DE, la aterosclerosis, y el EVA, comparten un denominador común, la inflamación sistémica de bajo grado; esta a su vez, empeora y cronifica estas alteraciones metabólicas. El abordaje terapéutico clásico y actual de la diabetes y sus complicaciones vasculares asociadas se han centrado en el estricto control de la glucemia. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, este control no ha sido capaz de prevenir adecuadamente la aparición de dichas complicaciones. Por ello, y debido a la elevada prevalencia de la enfermedad, cada vez es más necesario el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos cuyo objetivo sea paliar también esta inflamación crónica. En esta línea se han propuesto nuevos abordajes de la inflamación, entre ellos destaca la citoquina proinflamatoria IL-1 β , la cual, presenta unos niveles elevados y se ha visto implicada en la DM1, la destrucción de células β pancreáticas, la obesidad, la resistencia a la insulina, y el desarrollo de DM2, así como en la enfermedad vascular asociada a la diabetes, como se ha descrito anteriormente. Además, diversos estudios y recientes ensayos clínicos señalan a esta citoquina como una potencial diana de interés en el abordaje terapéutico de la inflamación sistémica presente en la diabetes, así como de las complicaciones vasculares asociadas a esta misma.

INTERLEUQUINA-(IL)-1 β

1. ILs: familia IL-1

Las ILs comprenden un amplio espectro de proteínas reguladoras dentro de la familia de las citoquinas. Son producidas por una gran variedad de tipos celulares, principalmente monocitos, macrófagos y linfocitos, pero también por el endotelio, células epiteliales, fibroblastos, músculo liso, neuronas y adipocitos. Estas ILs ejercen sus principales efectos en la regulación de la respuesta inmune, pero también participan en la patogenia de diversas enfermedades. Las ILs pueden ser proinflamatorias como las IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-17 y la IL-18, o bien antiinflamatorias, como las IL-4, IL-10, IL-11, IL-12, y la IL-13 (Fisman *et al.*, 2008). La familia de las IL-1 comprende 11 ILs diferentes, entre las que destacan, IL-1 α , IL-1 β , las diferentes isoformas de IL-36, IL-18, IL-33, y el regulador endógeno de IL-1 el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). Esta familia de ILs está implicada tanto en la respuesta inmune innata, como en la adaptativa. La IL-1 β apenas está presente en individuos sanos, su expresión se produce principalmente en monocitos circulantes, macrófagos, y células dendríticas, en respuesta a estímulos, como agentes patogénicos y a otras citoquinas como TNF α , IL-1 α , o la propia IL-1 β (Dinarello *et al.*, 2012).

2. Biogénesis, secreción y mecanismo de acción de la IL-1 β

La IL-1 β se produce como un péptido precursor no funcional, la pro-IL-1 β , y su activación se produce a través de la activación de unos complejos de la inmunidad innata denominados inflamomas, en especial el inflamoma NLRP3, el cual se describirá más adelante, y que permite la activación de la caspasa-1 que actúa sobre la pro-IL-1 β , dando lugar a la forma madura y activa de la citoquina, la IL-1 β , que es secretada al medio extracelular a través de diferentes vías (Baldrighi *et al.*, 2017).

Una vez secretada, la IL-1 β ejerce sus efectos en las células diana a través del receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R1), que se encuentra presente en todos los tipos celulares. Esta activación induce el reclutamiento de moléculas de señalización intracelular, como el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la quinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK) y el factor asociado al receptor de TNF6 (TRAF6). Estas moléculas a su vez van a inducir la activación de diferentes vías de señalización y de factores de transcripción, entre las que destacan la activación de la vía MAPK, la activación y translocación nuclear de NF- κ B, así como la activación de las vías p38/JNK y las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK (Fig. 6) (Palomo *et al.*, 2015).

La IL-1 β amplifica la respuesta inflamatoria incrementando la producción de mediadores inflamatorios como la IL-6, la cual actúa de forma sistémica incrementando la respuesta de fase aguda con la producción hepática de proteínas de fase aguda como la PCR, el fibrinógeno, y el inhibidor del activador del plasminógeno. Aunque estas respuestas son esenciales para el control y la resolución de infecciones, en algunas circunstancias son perjudiciales como en las enfermedades inflamatorias crónicas y el shock séptico (Gabay *et al.*, 2010; Grebe *et al.*, 2018).

La IL-1 β promueve el reclutamiento de células inflamatorias mediante la inducción de moléculas de adhesión en el endotelio, y mediante la liberación de quimioquinas en células estromales. Además, la IL-1 β estimula la producción de enzimas como la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa 2 y la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), las cuales liberan mediadores proinflamatorios como la prostaglandina E₂ y el NO, que puede combinarse O₂⁻ para formar peroxinitrito. Por otra parte, la IL-1 β estimula la liberación de metaloproteasas, las cuales que desestabilizan la matriz extracelular como se ha indicado anteriormente. Los efectos sistémicos de la IL-1 β incluyen hipotensión, fiebre, neutrofilia, trombocitosis y la inducción de citoquinas como la IL-6 y de proteínas de fase aguda como PCR (Gabay *et al.*, 2010).

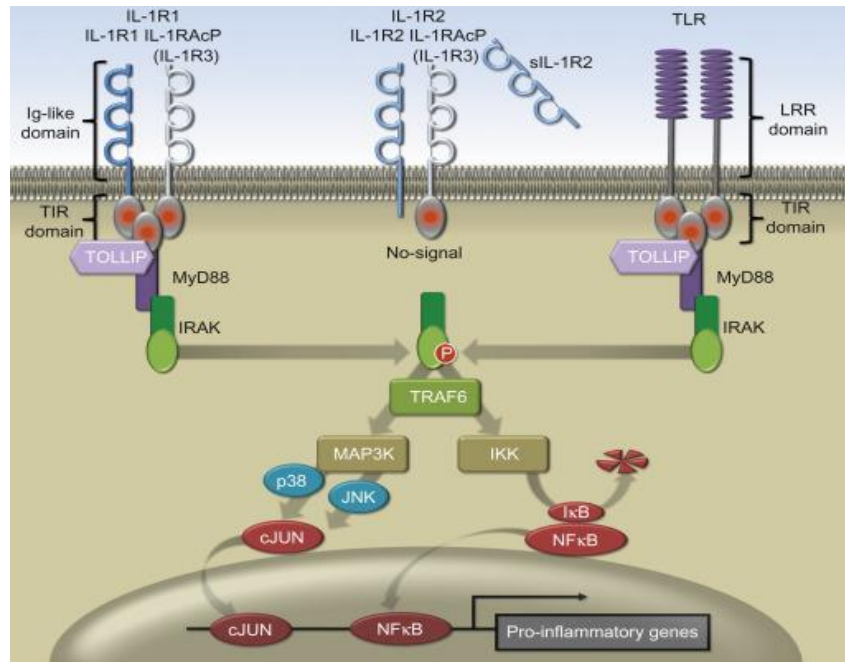


Figura 6. Vías de señalización intracelulares activadas tras la unión de IL-1 β y la activación del IL-1R1, y su similitud con la activación de receptores tipo Toll. La activación de IL-1R1 induce la activación de MyD88, IRAK, y TRAF6. Estas moléculas van a activar de vías de señalización como las MAPK y NF- κ B, y la expresión de genes proinflamatorios (O'Shea *et al.*, 2015).

3. IL-1 β , DM y obesidad

En cuanto a la obesidad, la resistencia a la insulina, y la DM2, se caracterizan por una producción anormal de citoquinas proinflamatorias, como se ha comentado con anterioridad. Entre ellas, se ha observado un incremento en la actividad de la IL-1 β y de proteínas de fase aguda como la PCR en pacientes obesos. Se ha descrito la capacidad de la IL-1 β de inducir resistencia a la insulina en tejidos diana como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo, a través de la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina y la degradación de los mismos, impidiendo la señalización normal de la insulina y generando resistencia a esta hormona (Shoelson, 2006; van Greevenbroek *et al.*, 2013; Lontchi-Yimagou *et al.*, 2013). Estos niveles elevados de IL-1 β se deben a diversos factores, entre los que destacan la liberación exacerbada de adipocinas, la acumulación de ácidos grasos y de colesterol, que activan el inflammasoma NLRP3, y una mayor infiltración de macrófagos (Herder *et al.*,

2015). Todos estos mediadores proinflamatorios, adipoquinas y citoquinas como la IL-1 β , son liberados en la circulación induciendo un gran impacto en la vasculatura. De hecho, la IL-1 β está considerada como un mediador clave en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes (Goldberg, 2009).

4. IL-1 β y vasculopatía diabética

Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación crónica de bajo grado es uno de los mecanismos subyacentes más importantes en la fisiopatología y etiología de la vasculopatía diabética. En este contexto, la IL-1 β tiene un papel clave en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes (Peiró *et al.*, 2017). En 2016, Ridker demostró que el bloqueo farmacológico de IL-1 β mejoró el perfil inflamatorio de los pacientes (Ridker, 2016).

Respecto al papel de la IL-1 β en la DE y el EVA, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la exposición *in vitro* de células endoteliales a la IL-1 β incrementaba la acumulación de células senescentes, así como la adquisición de un fenotipo secretor proinflamatorio, una mayor adhesión leucocitaria, y una mayor liberación de citoquinas contribuyendo al ambiente proinflamatorio (Romero *et al.*, 2019).

Uno de los mecanismos ya descritos para la aparición de la DE es la acumulación de ROS. En nuestro laboratorio se llevaron a cabo experimentos *in vivo* que demostraron que la IL-1 β inducía la DE a través de la interacción de su receptor IL-1R1 y la activación subyacente de la NOX (Vallejo *et al.*, 2014). Diferentes estudios señalan además el papel de la IL-1 β como un biomarcador y mediador clave en la calcificación vascular a través de diferentes mecanismos, como la expresión de fosfatasa alcalina o la mineralización, que favorecen la diferenciación y la adquisición de un fenotipo osteogénico por parte del músculo liso vascular de la capa media (Shobeiri y Bendeck, 2017). Estos resultados ponen de manifiesto el papel de la IL-1 β en el desarrollo de la rigidez arterial y el envejecimiento vascular prematuro característico de la diabetes, y que favorece la aparición de complicaciones vasculares.

En este sentido, se ha observado que la IL-1 β se encuentra sobreexpresada en las lesiones ateroscleróticas en humanos y en modelos animales de aterosclerosis. De hecho, se ha descrito el papel de la IL-1 β en la progresión y la ruptura de la placa aterosclerótica. Además, la IL-1 β actúa sobre el músculo liso vascular favoreciendo la hipertrofia de la capa media, a través de la inducción de su proliferación y migración hacia la capa neoíntima generando un remodelado vascular que reduce la luz del vaso y favorece la rigidez del mismo. También, se ha observado una correlación positiva entre una mayor calcificación de las placas ateroscleróticas y los niveles de IL-1 β . Por otra parte, las células endoteliales y el músculo liso vascular no son meras dianas de esta citoquina, sino que también la producen en respuesta a otros estímulos inflamatorios, incluido la propia IL-1 β (Shikama *et al.*, 2015; Herder *et al.*, 2015; Peiró *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018).

En el contexto de la diabetes, estudios en nuestro laboratorio demuestran que la inflamación producida por la IL-1 β en células vasculares se ve exacerbada en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. En células endoteliales humanas la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 producida por la IL-1 β o TNF α se vio incrementada en presencia de altas concentraciones de glucosa. Esta sinergia inflamatoria entre la IL-1 β y las elevadas concentraciones de glucosa indujo una mayor adhesión y migración leucocitaria endotelial en modelos animales *in vivo* (Azcutia *et al.*, 2010). De manera similar, en estudios *in vitro* la IL-1 β indujo la activación de vías proinflamatorias, como el eje ERK1/2, NF- κ B e iNOS en el músculo liso vascular, y esta activación se vio aumentada de manera proporcional a la concentración de glucosa (Lafuente *et al.*, 2008). El mecanismo de esta sinergia inflamatoria entre la IL-1 β y la glucosa se produce por un precondicionamiento de la citoquina sobre la célula muscular lisa. Así, la IL-1 β produce una mayor entrada de glucosa en la célula induciendo la expresión del transportador de glucosa (GLUT)-1. Este exceso de glucosa en la célula es derivado a la ruta metabólica de las pentosas fosfato, en la cual se genera una gran cantidad de NADPH, el cual es el sustrato de la NOX, induciéndose un exceso de ROS. Esta acumulación de estrés oxidativo va a inducir la activación exacerbada de NF- κ B y la sobreexpresión de iNOS debido

a la acción de la IL-1 β en presencia de altas concentraciones de glucosa tal y como ocurre en la diabetes (Fig. 7) (Peiró *et al.*, 2016).

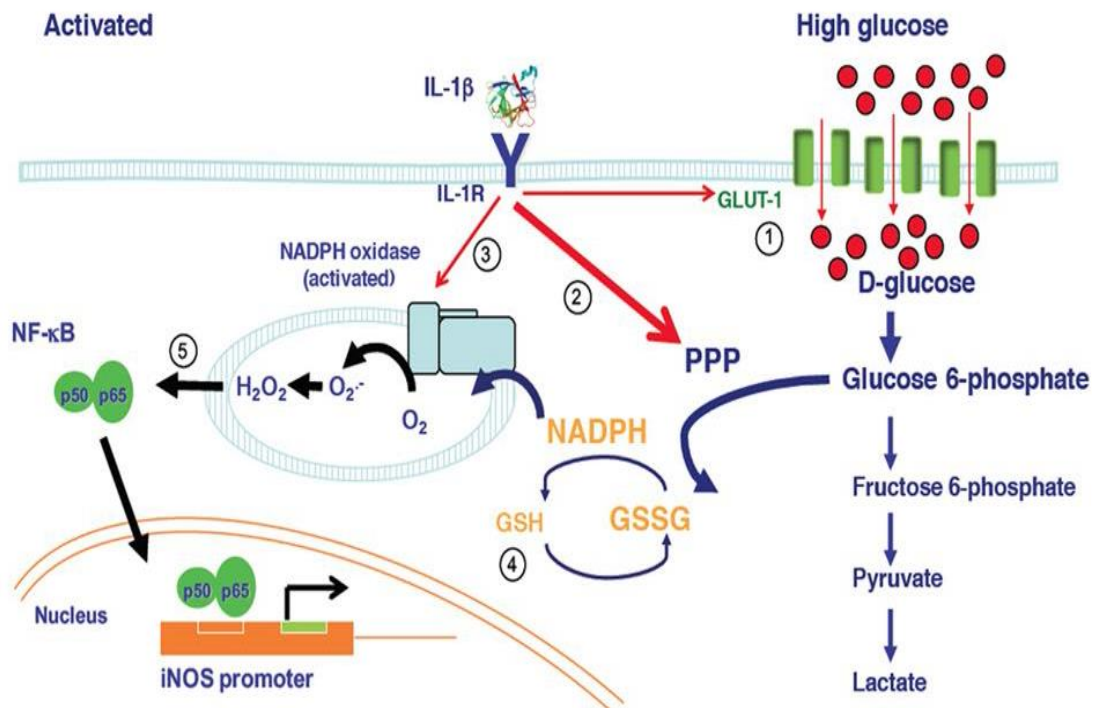


Figura 7. Vía de señalización a través de la cual los efectos proinflamatorios de la IL-1 β se ven exacerbados en presencia de altas concentraciones de glucosa. La IL-1 β incrementa la expresión de GLUT-1 en el músculo liso vascular, permitiendo la entrada de glucosa al interior. Este exceso de glucosa intracelular es derivado a la ruta de las pentosas fosfato produciéndose gran cantidad de NADPH. Todo ello favorece un incremento exacerbado de la actividad NOX y de la producción de ROS, que potencia la inflamación inducida por la IL-1 β (Peiró *et al.*, 2016).

5. Bloqueo farmacológico de la IL-1 β .

Otro de los factores que incrementan el interés por la IL-1 β como diana en la vasculopatía diabética es la disponibilidad de nuevos fármacos biológicos desarrollados recientemente y que inhiben o antagonizan los efectos deletéreos de la IL-1 β (Fig. 8). Actualmente, se dispone de diversos fármacos aprobados para su uso, entre los que destacan:

- a) Anakinra, proteína recombinante de corta acción que se corresponde con la forma no glicosilada del antagonista natural IL-1Ra. Bloquea las acciones de la IL-1 α y la IL-1 β , y destaca por su seguridad incluso en tratamientos prolongados (Peiró *et al.*, 2017). Respecto a su papel en la enfermedad vascular diabética, Larsen y su equipo describieron cómo la administración de anakinra en pacientes diabéticos mejoraba los niveles glucémicos con una mejora en la función β -pancreática y una disminución de los marcadores sistémicos de inflamación, como la IL-6 y la hsPCR, aunque no se estudiaron efectos cardiovasculares (Larsen *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la capacidad de anakinra para mejorar o prevenir el desarrollo de complicaciones vasculares (Dinarello *et al.*, 2012; Ridker, 2016). De hecho, estudios en nuestro laboratorio demuestran que, *ex vivo* o *in vitro*, anakinra es capaz de prevenir la disfunción endotelial y la inflamación del músculo liso vascular inducida por IL-1 β incluso en condiciones de hiperglucemia (Vallejo *et al.*, 2014; Peiró *et al.*, 2016).
- b) Los tratamientos desarrollados más recientemente son los anticuerpos monoclonales específicos frente a la IL-1 β , entre los que destacan canakinumab y gevokizumab. Este último se aprobó como medicamento huérfano para el tratamiento de algunas enfermedades raras. Canakinumab es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la IL-1 β soluble y la neutraliza, sin reacciones cruzadas con otras ILs, incluida la IL-1 α . (Dinarello *et al.*, 2012; Peiró *et al.*, 2017).

Aunque el desarrollo de estos fármacos tenía inicialmente como objetivo el abordaje y control de enfermedades autoinflamatorias como la artritis reumatoide, las crecientes evidencias preclínicas y ensayos clínicos acerca del papel de la citoquina en la patología diabética señalan el uso de estos fármacos como un abordaje potencial en la prevención y mejora de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes. En este sentido, como se ha indicado anteriormente Larsen y su equipo observaron como la administración de anakinra mejoraba la patología diabética (Larsen *et al.*, 2007). Sin embargo, la corta vida media de anakinra requería de administraciones diarias lo que

encarecía el coste del tratamiento. Además, el bloqueo de ambas isoformas IL-1 α e IL-1 β podría resultar perjudicial, por lo que canakinumab, que preserva la actividad de la IL-1 α y posee una mayor vida media, se presenta como un fármaco potencial para tratamientos de larga duración en el abordaje de las complicaciones vasculares de la diabetes.

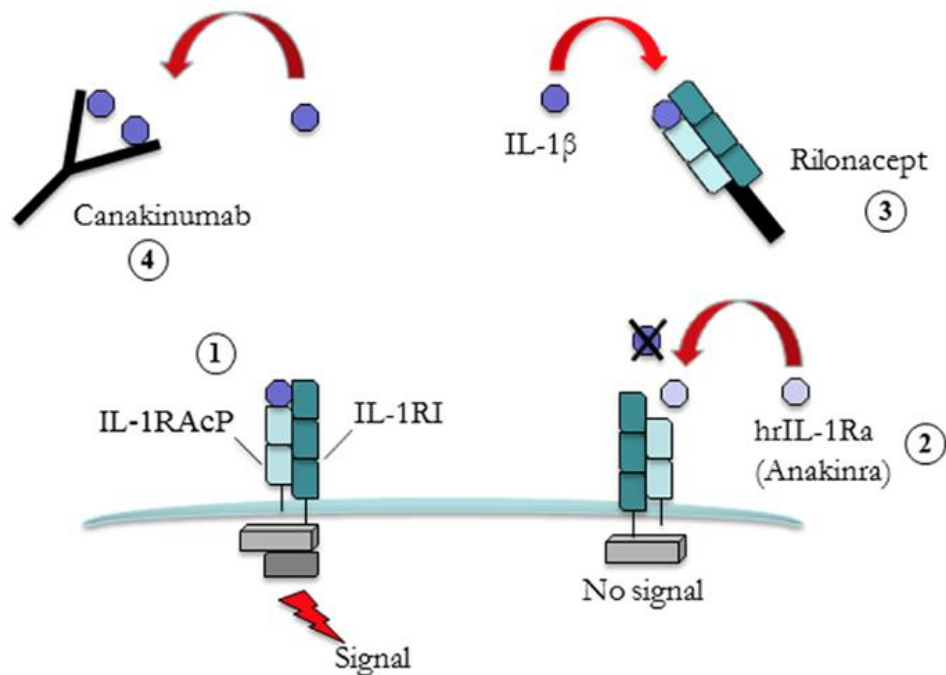


Figura 8. Mecanismo de acción de los diferentes fármacos biológicos frente a la IL-1 β . Tanto anakinra (2) como la citoquina endógena IL-1Ra (1) bloquean la acción de la citoquina mediante el bloqueo de IL-1R1, lo que también bloquea la señal de IL-1 α . Por otro lado, rilonacept (3) y canakinumab (4) secuestran a la IL-1 β soluble de manera específica, preservando la actividad de IL-1 α (Federici *et al.*, 2013).

En cuanto al uso de canakinumab para el abordaje de la diabetes cabe destacar el ensayo clínico CANTOS (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study), cuyo objetivo fue averiguar si la administración de canakinumab reduciría los eventos cardiovasculares (infarto agudo de miocardio y accidentes cerebrovasculares) en pacientes con DM2 que ya habían sufrido un evento previo y con alto riesgo cardiovascular (niveles de hsPCR por encima de 2 mg/L), mientras que los objetivos secundarios incluían la prevención y la mejora de la diabetes. Los resultados obtenidos demostraron que la

administración de canakinumab disminuía los niveles de IL-6 y hsPCR de manera dosis dependiente en comparación con el grupo placebo, mientras que los niveles de colesterol LDL y HDL no se vieron afectados por el tratamiento. A pesar de no modificar el perfil lipídico, el tratamiento con canakinumab redujo de manera significativa los eventos cardiovasculares en un 15% en comparación con el grupo placebo (Aday y Ridker, 2018; Ridker, 2019). Además, la administración de canakinumab en combinación con las actuales terapias estándar supuso una mejora en los parámetros cardiovasculares de pacientes con infarto agudo de miocardio previo. Las conclusiones principales del estudio CANTOS son, que la reducción de la inflamación sistémica de bajo grado, a través de la inhibición de la IL-1 β , en pacientes con riesgo cardiovascular disminuía la aparición de eventos cardiovasculares de forma independiente a los niveles de colesterol en sangre. Además, es el primer ensayo aleatorio a gran escala, con doble ciego y grupo control placebo que demuestra y apoya la hipótesis inflamatoria de la aterosclerosis. Por otra parte, confirma la importancia de las características proaterogénicas de la IL-1 β y su papel en el desarrollo de CVD, además de que el abordaje terapéutico de la IL-1 β puede mejorar el pronóstico de las CVD asociadas a la diabetes (Ridker, *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018; Aday y Ridker, 2018; Everett *et al.*, 2018).

Otro de los aspectos a tener en cuenta en la biología de la IL-1 β es su secreción y liberación que permiten su acción de forma autocrina, paracrina, e incluso endocrina. Diferentes estudios defienden la capacidad de algunos fármacos para disminuir esta secreción, entre los que destaca la sulfonilurea gliburida, y otros fármacos como el ácido okadaico, inhibidores de la esfingomielinasa, etc. Se han descrito diferentes mecanismos de secreción de la IL-1 β , uno de ellos es la liberación a través de la muerte celular mediada por caspasa-1 o piroptosis, la cual se detallará más adelante. Otro mecanismo descrito recientemente en células del sistema inmune y del sistema nervioso es la liberación de IL-1 β a través de su transporte en vesículas extracelulares, el empaquetamiento de la citoquina en microvesículas procedentes de la membrana celular y en exosomas procedentes de cuerpos multivesiculares citoplasmáticos. Debido a la corta vida media en plasma que presenta la IL-1 β , sugiere que el transporte de la misma en estas vesículas permite mantener su

actividad, así como su transporte y ejercer sus efectos de forma paracrina o endocrina (Lopez-Castejon y Brough, 2011). Por ello el transporte de IL-1 β a través de estas vesículas puede ser una diana clave en el desarrollo de la inflamación sistémica de bajo grado en pacientes diabéticos.

Como se ha indicado anteriormente, la IL-1 β se produce a través de un mecanismo que implica la formación de un complejo de la inmunidad innata, el inflamasoma NLRP3, dada la importancia que presenta la IL-1 β en la diabetes y en sus complicaciones vasculares asociadas, el estudio, la modulación o el abordaje de este complejo puede ser de gran importancia en las patologías asociadas con altos niveles de esta citoquina.

INFLAMASOMA NLRP3

1. Los inflamasomas

La inmunidad innata se caracteriza por la presencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales, permiten detectar agentes patogénicos. Estos se expresan bien en la membrana celular, como los receptores tipo Toll (TLR) que interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en el medio extracelular, o bien, presentan una expresión intracelular. El objetivo de la transducción de señales de estos receptores es la activación de los factores de transcripción NF- κ B y activador de proteína (AP)-1, los cuales, desencadenan la liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (Schroder y Tschopp, 2010).

Otro tipo de PRR son los receptores de oligomerización y unión a nucleótidos, los receptores tipo NOD (NLR), que reconocen tanto PAMP, como patrones asociados a daño molecular (DAMP) en el interior celular. Los NLR están formados por 3 dominios proteicos estructurales, el dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR), responsable del reconocimiento de PAMP, un dominio de central de oligomerización de unión a nucleótidos (NACHT), esencial para la activación de este complejo a través de la oligomerización dependiente de ATP, y un dominio N-terminal, que puede ser de reclutamiento de caspasa (CARD) o de pirina (PYD), el cual media las interacciones homotípicas proteína-proteína (Zheng *et al.*, 2011).

Los inflamasomas son complejos multiproteicos citoplasmáticos formados por la unión y oligomerización de proteínas accesorias junto con receptores NLR que incluyen los receptores NLRP1, NLRP3, NLRC4, pero también existe el inflamasoma ausente en melanoma o AIM2 que contienen un dominio pirina y un dominio de unión al ADN. Dependiendo del tipo de estos receptores, los inflamasomas pueden reconocer y activarse con diversos estímulos PAMP o DAMP (Fig. 9) (Zheng *et al.*, 2011; Hoseini *et al.*, 2018; Grebe *et al.*, 2018).

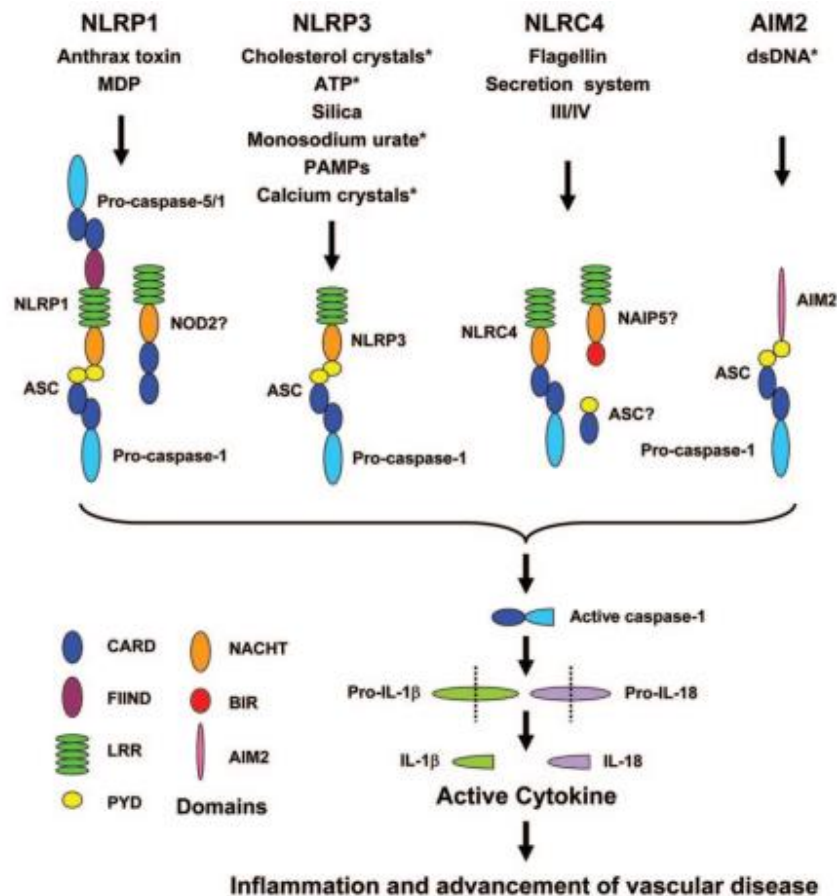


Figura 9. Representación de los 4 principales inflamasomas, así como sus componentes, organización y algunos de estímulos activadores. La activación de los diferentes inflamasomas NLRP1, NLRP3, NLRC4, y AIM2 converge en el reclutamiento de la caspasa-1, y su posterior activación para inducir en último término la activación y liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-18, promoviendo la inflamación crónica de bajo grado (Zheng *et al.*, 2011).

La activación y el ensamblaje de los inflamasomas sigue un orden y suele necesitar de tres elementos, una proteína sensor, una proteína adaptadora y una proteína efectora. Para que se produzca esta activación el receptor sufre cambios conformacionales permitiendo su propia oligomerización, o bien, varios receptores se unen a un ligando de oligomerización común. En ambos casos, la oligomerización del receptor permite el reclutamiento de la proteína adaptadora del inflamasoma, la proteína tipo *speck* asociada a la apoptosis (ASC) que contiene un dominio CARD. ASC consta de dos dominios asociados a apoptosis, que permiten las reacciones de oligomerización. El reclutamiento de las moléculas ASC por parte del receptor, ya en oligomerización, promueve la

formación de un filamento de ASC-PYD, de manera que los dominios CARD de las moléculas de ASC quedan orientados hacia el exterior del filamento (Hoss *et al.*, 2016; Grebe *et al.*, 2018).

A través de interacciones homotípicas CARD-CARD, los filamentos ASC-PYD pueden entrecruzarse y formar una estructura de oligomerización a través de las interacciones entre sus dominios PYD denominada *speck*, y unirse a la forma inmadura del efector del inflammasoma, la pro-caspasa-1, lo que promueve una maduración autocatalítica para dar lugar a su forma activa, la caspasa-1 madura. Esta forma madura de caspasa-1 es capaz de procesar las formas no activas de las citoquinas pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus formas activas e induce su liberación (Hoss *et al.*, 2016). Además, se ha descrito el papel de la caspasa-1 activa en el procesamiento de la gasdermina D, la cual, a través de su oligomerización, forma poros en la membrana haciendo que esta pierda su integridad y dando lugar a la muerte celular dependiente de caspasa-1 o piroptosis asociada a la liberación de las formas maduras de IL-1 β e IL-18 (He *et al.*, 2015)

2. El inflammasoma NLRP3

El inflammasoma NLRP3 ha sido el más estudiado y caracterizado de los inflammasomas en macrófagos, pero también se ha identificado en otros tipos celulares como músculo liso vascular, endotelio y linfocitos T. Actualmente se han descrito dos mecanismos de activación de NLRP3 (Baldrighi *et al.*, 2017) que se describen a continuación.

La activación canónica de NLRP3 se caracteriza por ser un proceso bifásico en el que dos señales, cebado y activación, son necesarias para que se lleve a cabo la activación, lo que permite un control más estrecho de la respuesta inflamatoria. NLRP3 se encuentra presente a bajos niveles en las células y su expresión se incrementa cuando se produce el cebado en respuesta a diversos estímulos, como la activación de los receptores TLRs por PAMP o DAMP, así como por la acción de citoquinas inflamatorias a través de sus receptores como

la IL-1 β , entre otros. Estos estímulos inducen la expresión de NLRP3 y la pro-IL-1 β a través de la activación de NF- κ B (Fig. 11) (Shao *et al.*, 2015).

La fase de activación del inflamasoma NLRP3 requiere de un segundo estímulo y se caracteriza por la fosforilación y el reclutamiento de la proteína ASC, y la formación del complejo *speck*, la activación de la caspasa-1, y el consecutivo procesamiento y activación de las citoquinas IL-1 β e IL-18. Actualmente, este proceso de activación se encuentra bajo continuo estudio y se han descrito numerosos estímulos desencadenantes de la activación del inflamasoma NLRP3, indicando la implicación de varias vías de señalización (Baldrighi *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018). Los principales activadores del inflamasoma NLRP3 descritos en la literatura incluyen la ruptura de los lisosomas por la presencia de cristales de colesterol o de urato, el flujo de potasio K⁺ a través del receptor purinérgico P2X7 por la acción de toxinas bacterianas o el DAMP adenosín trifosfato (ATP), así como el estrés del retículo endoplasmático, y el daño mitocondrial con la consecuente liberación de ADN mitocondrial y de ROS (Fig.10) (Hoseini *et al.*, 2018).

A pesar del concepto estándar de la necesidad de dos señales diferentes para la activación de NLRP3, existe la posibilidad que una misma molécula induzca ambas señales y la activación a través de la vía no-canónica de NLRP3. Uno de los principales activadores de esta vía no canónica es el lipopolisacárido intracelular de bacterias Gram negativas (LPS), el cual es capaz de unirse directamente a estas caspasas (Kayagaki *et al.*, 2013).

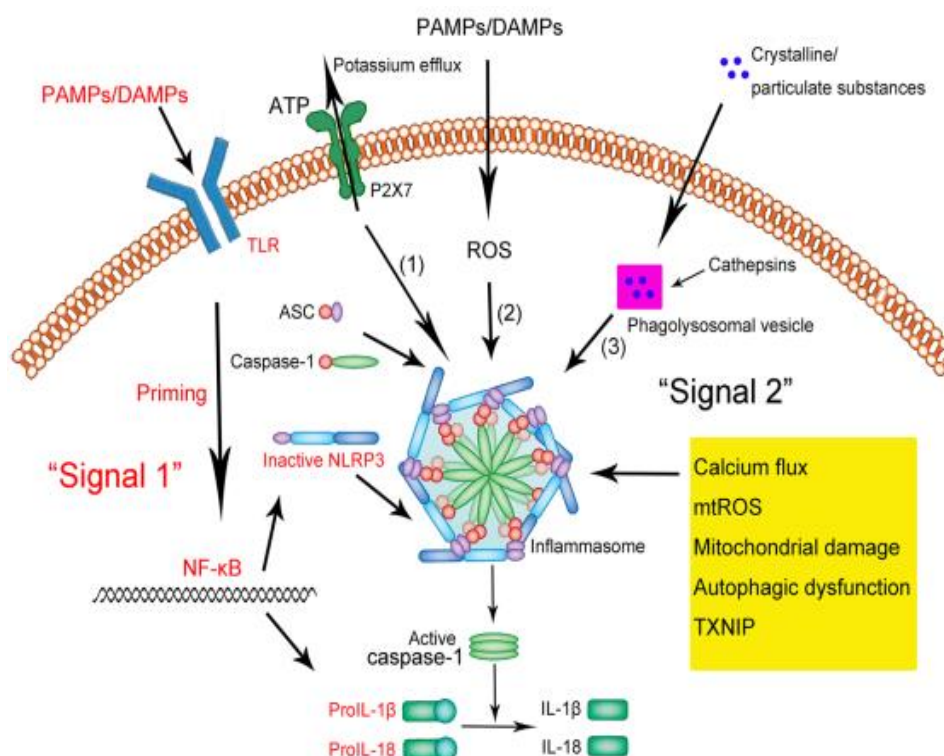


Figura 10. Ilustración esquemática de la activación del inflamasoma NLRP3. La activación del inflamasoma NLRP3 es un proceso bifásico que requiere dos señales. La primera señal induce la fase de cebado con la activación de NF- κ B, y la expresión de NLRP3 y pro-IL-1 β . La segunda señal induce la oligomerización de las proteínas NLRP3, la proteína ASC, y la pro-caspasa-1 para formar un complejo denominado *speck* en el que se produce la activación de la caspasa-1, la cual va a inducir en último término, la activación y liberación de la IL-1 β y la IL-18 (Shao *et al.*, 2015).

3. Inflamasoma NLRP3, obesidad y diabetes

El papel del inflamasoma NLRP3 en el proceso autoinmune del desarrollo de la DM1 aún está por determinar. Aunque algunas evidencias sugieren un papel de los TLRs en el desarrollo de la DM1, no se ha descrito un mecanismo específico del NLRP3 en la etiología de la DM1 (Ding *et al.*, 2019). Por el contrario, en los últimos años numerosas evidencias señalan el importante papel del inflamasoma NLRP3 en el desarrollo de la obesidad, la resistencia a la insulina y de la DM2.

Como se ha descrito previamente, la obesidad y la DM2 se caracterizan por una inflamación crónica y estéril de bajo grado, la cual se manifiesta por

elevados niveles séricos de citoquinas proinflamatorias. Un exceso en la ingesta calórica se ha relacionado con mayores niveles de ácidos grasos saturados, los cuales actúan como DAMPS que activan el inflamasoma NLRP3. De hecho, el tejido adiposo de estos pacientes también presenta elevados niveles de los componentes del inflamasoma, lo que establece un mecanismo de unión entre el exceso de nutrientes y la inflamación (Rheinheimer *et al.*, 2017). Por otra parte, todos estos mediadores proinflamatorios, adipoquinas y DAMP, así como el producto efector del inflamasoma, la IL-1 β , antagonizan la acción de la insulina dando lugar al desarrollo de la resistencia a la insulina (Lontchi-Yimagou *et al.*, 2013).

Por otra parte, numerosos estudios indican un papel de la activación del inflamasoma NLRP3 en la alteración del islote pancreático durante el desarrollo de la DM2. La exposición crónica de la célula β a elevados niveles de glucosa incrementa la formación de ROS, presumiblemente a través de la NOX y el aumento del metabolismo glucolítico. De hecho, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo están estrechamente implicadas en el desarrollo de la enfermedad. Tras la activación del inflamasoma, la IL-1 β resultante es secretada de manera autocrina y paracrina, promoviendo la muerte de las células β y la alteración en su funcionalidad. Además, favorece el reclutamiento e infiltración de células inmunitarias, lo que contribuye a la destrucción de las células β . Todos estos mecanismos establecen un círculo vicioso que conduce al desarrollo de la DM2 (Schroder *et al.*, 2010). Asimismo, el péptido amiloide β pancreático se acumula formando depósitos en el páncreas de los pacientes diabéticos, y contribuye a la secreción de IL-1 β activando del inflamasoma NLRP3 (Masters *et al.*, 2010).

Todo ello indica la contribución del inflamasoma NLRP3 como un sensor de DAMPS metabólicos en la diabetes, y su contribución al mantenimiento del ambiente proinflamatorio que conduce a la resistencia a la insulina. y a la DM2 (Fig. 11) (Esser *et al.*, 2014).

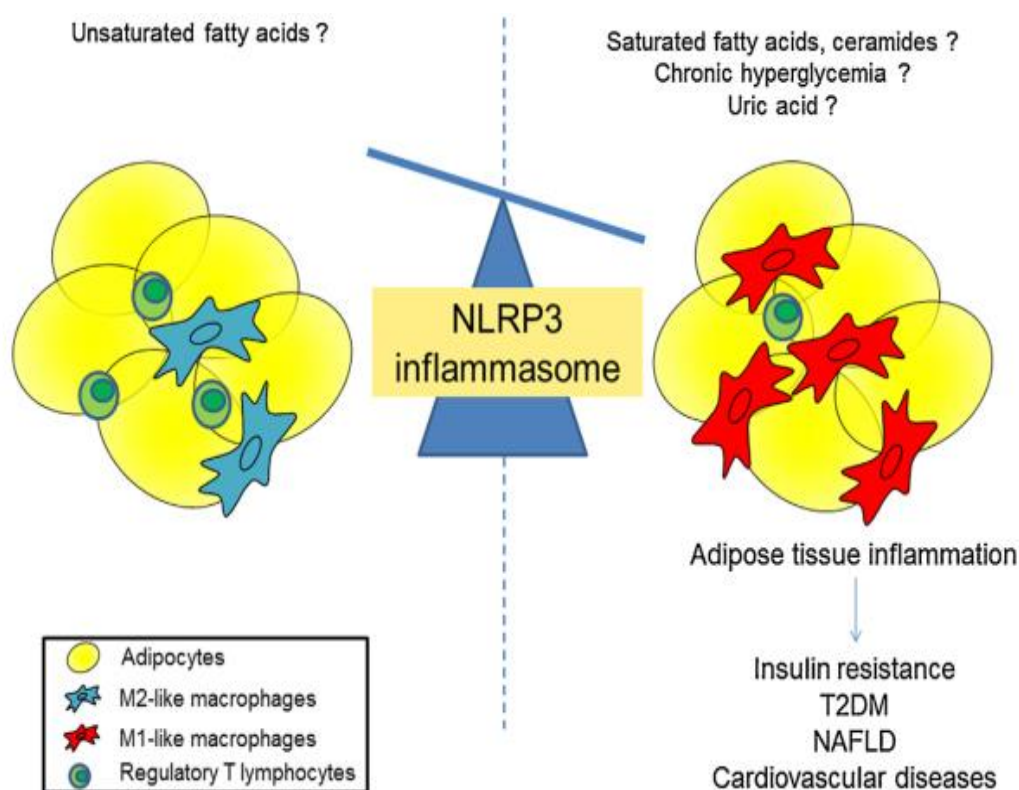


Figura 11. El papel del inflammasoma NLRP3 en la inflamación del tejido adiposo, y el desarrollo de resistencia a la insulina y DM2. Durante la diabetes, se acumulan mediadores como los ácidos grasos saturados, cristales de colesterol y de urato en el tejido adiposo, los cuales, junto a la hiperglucemia favorecen la activación del inflammasoma NLRP3, induciéndose la inflamación del tejido adiposo, lo que favorece la resistencia a la insulina, la DM2, y la aparición de complicaciones vasculares (Esser *et al.*, 2014).

4. Inflamasoma NLRP3 y vasculopatía diabética

Un número creciente de evidencias sugieren que la activación del inflammasoma NLRP3 puede ser un mecanismo patológico de gran importancia en el mantenimiento de la inflamación crónica y el desarrollo de la vasculopatía en pacientes diabéticos. Por ello, se sugiere que el inflammasoma NLRP3 y las citoquinas proinflamatorias pueden ser biomarcadores de interés en la detección del riesgo cardiovascular (Pavillard *et al.*, 2018).

La aparición temprana de lesiones ateroscleróticas es una de las grandes protagonistas en la macrovasculopatía diabética. Uno de los principales factores en la iniciación de la aterosclerosis es el incremento de los niveles de colesterol en sangre y su acumulación en las lesiones ateroscleróticas en forma de cristales y de LDL oxidadas. Estudios recientes señalan que estos cristales de colesterol actúan como activadores del inflamasoma a través de procesos de ruptura lisosomal y de disfunción mitocondrial, mientras que las LDL podrían actuar al nivel de la fase de cebado a través de vías que inducen la activación de TLR4 y NF- κ B (Grebe *et al.*, 2018). En estos estudios, la inhibición genética o farmacológica del inflamasoma o de alguno de sus componentes en modelos animales atenuó o previno la aparición y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, lo cual confirma el importante papel del inflamasoma NLRP3 en el desarrollo de la aterosclerosis (Baldrighi *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018).

Estudios de nuestro laboratorio han demostrado como la IL-1 β *in vitro* en células endoteliales y en modelos animales murinos es capaz de inducir DE (Vallejo *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2019). Asimismo, otra de las adipocinas sobreexpresadas en la DM2 y en la obesidad, la visfatina, ha demostrado inducir la DE a través de la activación del eje TLR4/NLRP3 (Romacho *et al.*, 2020). Otros estudios ajenos al laboratorio han observado en modelos animales diabéticos la sobreexpresión de los componentes del inflamasoma, a la vez que la inhibición genética de NLRP3 prevenía la hiperpermeabilidad endotelial y la infiltración de macrófagos. En la DE, se ha demostrado que tanto el estrés oxidativo, como las citoquinas liberadas promueven la activación del inflamasoma NLRP3, perpetuando y acentuando la liberación de citoquinas (Yin *et al.*, 2017).

En cuanto a la implicación del inflamasoma NLRP3 en la microvasculopatía diabética, diversos estudios demuestran el posible papel del inflamasoma en la progresión de la retinopatía y la nefropatía (Rovira-Llopis *et al.*, 2018). Estudios en células epiteliales de retina demostraron que la exposición a elevados niveles de glucosa incrementaba la expresión de los componentes de NLRP3. Además, se observó que en muestras de humor vítreo de pacientes diabéticos con retinopatía se manifestaban unos mayores niveles de caspasa-1 y de IL-18, así como una mayor expresión de la proteína NLRP3, los cuales aumentaron con el progreso de la enfermedad (Shi *et al.*, 2015; Loukovaara *et*

al., 2017). En cuanto a la nefropatía diabética, diversos estudios con modelos animales de diabetes deficientes en NLRP3 presentaron una protección frente al desarrollo de nefropatía diabética (Shahzad *et al.*, 2015).

La mayoría de los efectos y consecuencias del inflamasoma se deben al papel fundamental de sus mediadores efectores, las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-18, en especial la IL-1 β . Como se ha descrito previamente, uno de los mecanismos estudiados en los últimos años es la liberación de IL-1 β , e incluso de otros componentes del inflamasoma NLRP3, a través de vesículas extracelulares, el empaquetamiento de estos en estas vesículas permite su transporte para ejercer sus efectos de forma paracrina o endocrina y mantener su actividad prolongando su vida media (Lopez-Castejon y Brough, 2011). Por ello, el transporte de IL-1 β y de otros componentes del inflamasoma NLRP3 a través de estas vesículas podría ser clave en el desarrollo de la inflamación sistémica de bajo grado en pacientes diabéticos.

VESÍCULAS EXTRACELULARES

La liberación o secreción de vesículas extracelulares (EVs) es un proceso evolutivo conservado tanto en organismos procariotas como en eucariotas, unicelulares o pluricelulares. El origen, la naturaleza, y las características de estas vesículas son muy diversas. En organismos pluricelulares se han aislado vesículas en diferentes fluidos corporales como sangre, orina, saliva, o líquido cefalorraquídeo (Colombo *et al.*, 2014). Numerosos estudios han demostrado la participación de estas vesículas en los procesos de comunicación intercelular y en la regulación de diferentes procesos celulares. Además, estas vesículas pueden ser biomarcadores potenciales gracias a su estabilidad, facilidad de detección y posibilidad de obtención sin métodos altamente invasivos. Estas vesículas son estructuras rodeadas por una bicapa lipídica que contiene en su interior lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos procedentes de la célula donadora. En los últimos años se han descrito numerosas nomenclaturas para clasificar los diferentes tipos de vesículas, si bien el criterio de clasificación actual se basa en el origen intracelular de estas vesículas. De esta manera se clasifican en tres poblaciones principales: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (Mallocci *et al.*, 2019). En esta tesis nos centraremos en el estudio de las microvesículas o vesículas de gran tamaño (IEVs, del inglés “large-EVs) y los exosomas o vesículas de pequeño tamaño (sEVs, del inglés “small-EVs), y su implicación en la diabetes y sus complicaciones cardiovasculares asociadas.

1. Tipos de vesículas extracelulares

1.1 *Vesículas de gran tamaño o microvesículas (IEVs)*

Las IEVs fueron descubiertas en 1967 por Peter Wolf como restos plaquetarios y celulares procedentes de células dañadas (Wolf, 1967). Estas se caracterizan por presentar marcadores de superficie que indican su origen celular, y una gran cantidad de fosfolípidos de carga negativa, como la fosfatidilserina. Las IEVs poseen un rango de tamaño de entre 100 y 1.000

nanómetros (nm) aproximadamente, el cual puede solaparse con el de los exosomas, por ello son necesarias técnicas de alta sensibilidad para caracterizar y distinguir ambas poblaciones (Yin *et al.*, 2015).

Las IEVs se originan a partir de la formación de protuberancias o protrusiones de la membrana plasmática tras la activación de las células. Esta activación permite la entrada de calcio (Ca^{2+}) al interior celular que induce la externalización de la fosfatidilserina a la membrana. Este incremento del Ca^{2+} intracelular está asociado con la activación de las vías de señalización ERK y las quinasas asociadas a Rho (ROCK1), así como con un incremento del estrés oxidativo y de la actividad de la NOX. Estos fenómenos inducen la disrupción del citoesqueleto, y van a favorecer la formación de las IEVs, las cuales son liberadas finalmente por un proceso de fisión. Aunque aún son necesarios nuevos estudios, se han descrito diferentes estímulos fisicoquímicos que llevan a la activación o a la apoptosis celular, y que precede a la liberación de las IEVs. Entre ellos destacan, citoquinas proinflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$ o compuestos como la actinomicina D que favorecen la entrada de Ca^{2+} y la formación de microvesículas (Fig. 12) (Martinez *et al.*, 2011).

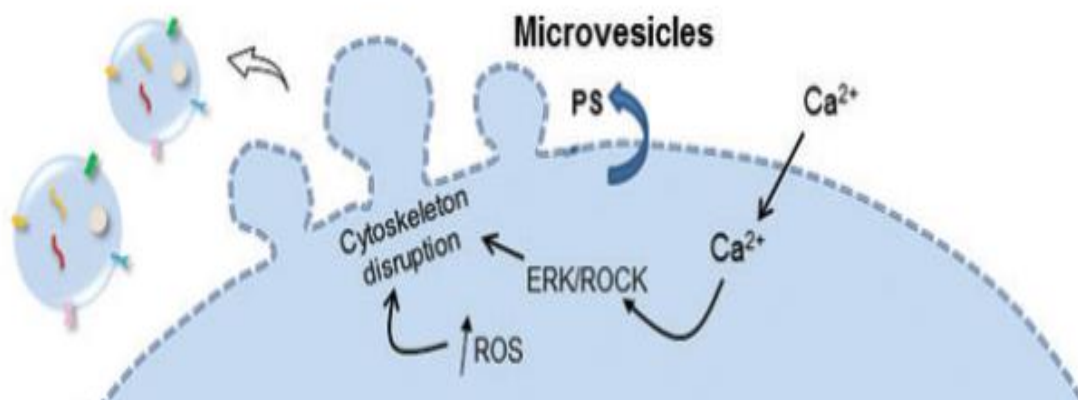


Figura 12. Biogénesis y formación de las IEVs. Las IEVs se originan a partir de protrusiones en la membrana plasmática, las cuales se producen en respuesta a un incremento de ROS, y a la entrada de Ca^{2+} , que activa la vía ERK/ROCK1, que conducen finalmente a la disrupción del citoesqueleto y a la formación de las IEVs por un proceso de fisión. Adaptada de (Mallocci *et al.*, 2019).

Numerosos tipos celulares son capaces de producir IEVs *in vitro*, destacando células endoteliales, plaquetas, leucocitos, eritrocitos, células tumorales, músculo liso vascular, etc. En cuanto a su presencia en fluidos corporales, el 70-90% de IEVs circulantes en sangre son de origen plaquetario, mientras que en orina proceden principalmente de células renales como podocitos, y células glomerulares. En cuanto a la composición de estas vesículas, depende principalmente del tipo celular de origen, así como del estímulo que induce su formación y liberación. En cualquier caso, se caracteriza por la presencia de elementos procedentes de la membrana de origen, como ligandos y receptores, los cuales sirven de antígenos que permiten la caracterización de estas IEVs mediante el uso de anticuerpos. También presentan ácidos nucleicos, como ARN mensajero (ARNm) y micro ARN (miARN), lo que indica la capacidad de estas IEVs de transferir material genético a las células diana, así como proteínas procedentes de la mitocondria, el núcleo y otros compartimentos citosólicos de la célula de origen. Esta dependencia en la composición de las IEVs de la célula de origen no hace posible la elaboración de una lista de proteínas específicas de IEVs, aunque sí que es común la presencia de proteínas estructurales del citoesqueleto (Cocucci *et al.*, 2009; Mallocci *et al.*, 2019).

Recientes estudios describen diferentes mecanismos a través de los cuales las IEVs interactúan con sus células diana. Uno de los mecanismos es la interacción receptor/ligando, el cual puede permitir la internalización de las IEVs en la célula diana a través de procesos de endocitosis, o bien, activar vías de señalización en la membrana sin necesidad de internalización de las IEVs. Otro de los mecanismos implica la internalización por endocitosis, la cual puede ser de varios tipos, mediada por clatrina, por caveolina, por balsas lipídicas y de colesterol, o por mecanismos de macropinocitosis y fagocitosis. El tipo de endocitosis dependerá del tipo celular y del estado fisiológico de la misma, así como de la presencia de ligandos y de receptores compatibles en la superficie de la membrana de ambas. También se puede producir la fusión de las membranas de la MV y de la célula permitiendo la liberación de los mediadores que esta contiene (Fig. 14) (Martinez *et al.*, 2011; Abels y Breakefield, 2016).

1.2 Vesículas de pequeño tamaño o exosomas (sEVs)

Los exosomas o sEVs se describieron en primer lugar como vesículas de escala nanométrica con origen endosómico, y liberadas como resultado de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Las sEVs presentan un rango de tamaño de entre 30 y 150 nm, dependiendo de la célula de origen. La identificación y caracterización de sEVs requiere el análisis por “nanotracking”, así como la identificación de marcadores proteicos específicos presentes en los mismos, entre los que destacan las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, la proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral TSG101, y la proteína X de interacción con ALG-2 (ALIX) (Lötvall *et al.*, 2014).

Las sEVs se forman como vesículas intraluminales originadas a través de la invaginación de la membrana de un endosoma temprano, de manera que las proteínas, lípidos y parte del citoplasma quedan contenidos en la vesícula intraluminal. Los endosomas tempranos maduran a endosomas tardíos, los cuales acumulan gran cantidad de vesículas intraluminales y forman una estructura conocida como cuerpo multivesicular (MVB). Los MVB pueden a su vez fusionarse con los lisosomas para la degradación de su contenido, o bien fusionarse con la membrana plasmática celular y liberar las vesículas intraluminales al exterior celular donde reciben el nombre de exosomas. Se han descrito diferentes mecanismos de formación de estos exosomas, los cuales, se clasifican en dos grupos distintos (Fig. 13) (Abels y Breakefield, 2016). Por una parte, se puede dar una formación dependiente del complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte (ESCRT). La maquinaria ESCRT está formada por cuatro complejos proteicos: ESCRT-0, -I, -II, y -III, y proteínas asociadas a estos complejos como TSG101 y ALIX (Colombo *et al.*, 2013). Por otra parte, la formación independiente del ESCRT es una vía de formación de exosomas que estaría mediada por el eje sindecano/sintenina-1/ALIX. Además, los exosomas procedentes de esta vía presentan una gran concentración de tetraspaninas CD63, CD81, CD9 y TSG101 (Baietti *et al.*, 2012).

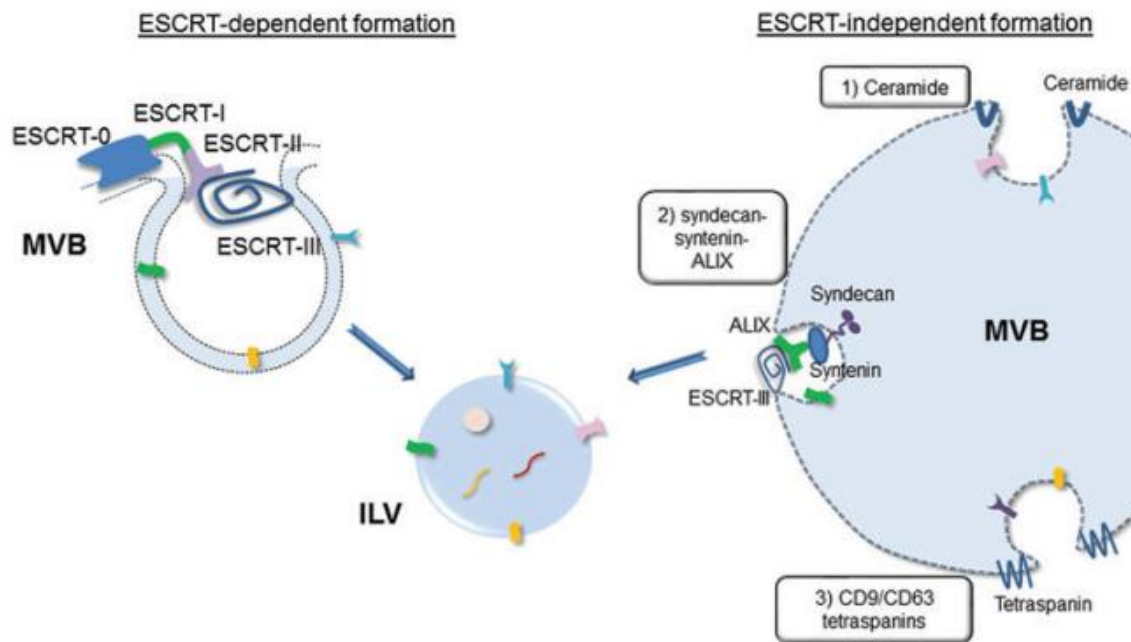


Figura 13. Biogénesis y formación de las sEVs. Las sEVs se originan como vesículas intraluminales, éstas se forman clásicamente a través del complejo ESCRT, pero se han descrito otras 3 vías independientes del ESCRT, a través de ceramidas, del complejo sindecano/sintenina-1/ALIX, y de tetraspaninas como CD9 y CD63 (Mallocci *et al.*, 2019).

La liberación de las sEVs al medio extracelular se produce a través de la fusión de la membrana del MVB y la membrana plasmática de la célula. Se han propuesto diferentes mecanismos de liberación como ocurre en el caso de la biogénesis. Uno de estos mecanismos está mediado por la familia de proteínas Rab, enzimas guanosina trifosfatasa (GTPasa), que intervienen en el tráfico vesicular en el interior de la célula, así como en la fusión de la membrana del MVB y la membrana plasmática, y la liberación de los exosomas. Otra familia de proteínas implicadas es la familia de proteínas vesiculares de fijación soluble del factor sensible a N-etilmaleimida o vSNARE, entre las que destaca la proteína de membrana asociada a vesículas 7 o VAMP7, implicada en los procesos de fusión de membranas y liberación de sEVs (Abels y Breakefield, 2016).

En cuanto a la composición de las sEVs, al igual que las IEVs presentan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos embebidos en la bicapa lipídica, al contrario de lo que ocurre en las IEVs, las sEVs presentan proteínas específicas procedentes de los mecanismos de formación de éstas mismas, como las

tetraspaninas CD9, CD63, CD81, y las proteínas asociadas al complejo ESCRT, ALIX y TSG101, y de los mecanismos de liberación como proteínas de la familia Rab y SNARE (Colombo *et al.*, 2014; Mallocci *et al.*, 2019). Respecto al contenido lipídico, los exosomas presentan una composición de lípidos derivada del origen celular, aunque con ciertas similitudes independientes del origen, como el colesterol, esfingomiélin, ceramida y fosfatidilserina, así como ácidos grasos saturados y derivados como el ácido araquidónico y la prostaglandina E2 (Record *et al.*, 2014). En cuanto al contenido de ácidos nucleicos, al igual que las IEVs, las sEVs pueden transferir material genético a las células diana, aunque se ha observado la presencia de ADN genómico y mitocondrial en algunos casos. El uso de técnicas de secuenciación de nueva generación ha permitido identificar una gran cantidad de ARN pequeño, como el ARNm, microARN y ARN no codificantes; su transporte a través de sEVs permite la protección de los ARN de la degradación por parte de ARNasas extracelulares (Abels y Breakefield, 2016).

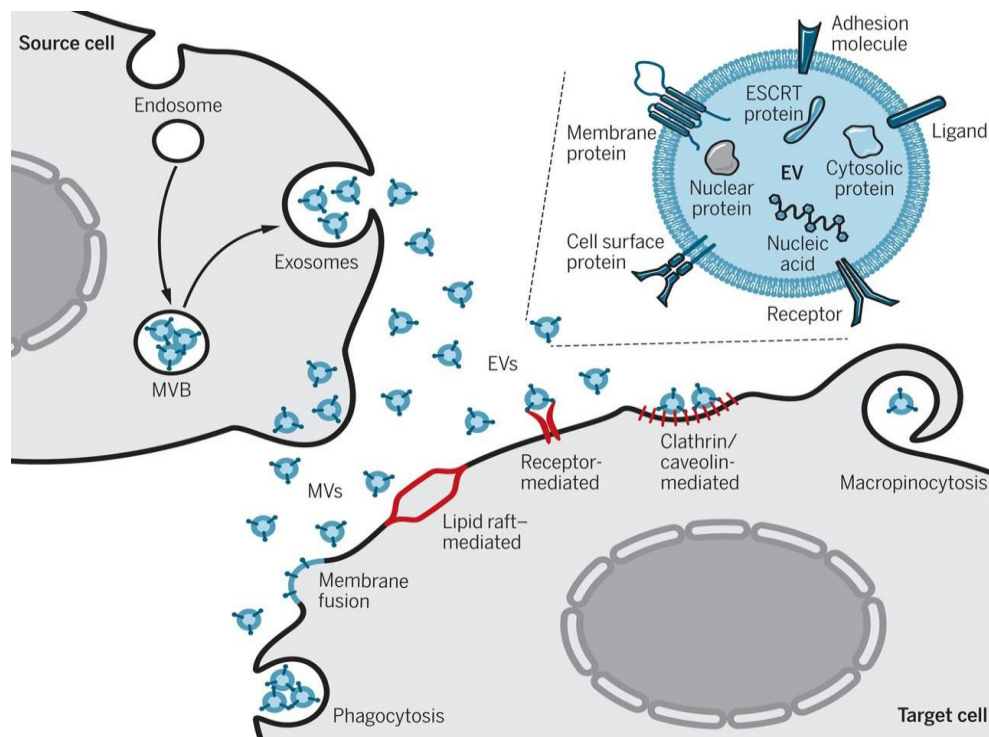


Figura 14. Composición y mecanismos de interacción de las EVs con las células diana. Las EVs pueden interactuar con las células diana a través de diferentes procesos, como fagocitosis, o endocitosis mediada por clatrina, por caveolina, o por balsas lipídicas, así como por procesos de fusión de membranas o por interacciones ligando receptor (Wiklander *et al.*, 2019).

La interacción de las sEVs con las células diana sigue los mismos procesos y mecanismos que se han detallado previamente con las IEVs, la interacción entre ligandos y receptores, la fusión de las membranas de la sEV y de la célula receptora, o bien a través de procesos de internalización por endocitosis mediada por clatrina, caveolina, balsas lipídicas o de colesterol, o a través de mecanismos de pinocitosis y fagocitosis (Fig. 14) (Mallocci *et al.*, 2019).

2. Vesículas extracelulares, obesidad, y diabetes

Diversos estudios, entre los que destaca el llevado a cabo por Freeman y su equipo, han indicado que los pacientes diabéticos presentan unos mayores niveles de EVs en sangre que los pacientes sanos, además, se ha observado un incremento de los niveles séricos de estas vesículas con el progreso de la enfermedad (Freeman *et al.*, 2018). Este incremento se observó en ambas poblaciones de vesículas IEVs y sEVs, y su procedencia era principalmente de origen eritroide, leucocitario y plaquetario (Freeman *et al.*, 2018). En cuanto a la obesidad, diferentes estudios correlacionan positivamente un aumento de los niveles de EVs circulantes con el aumento del índice de masa corporal. De hecho, la concentración de EVs en pacientes obesos es mucho mayor que en pacientes sanos y este incremento también se observó en ambas poblaciones IEVs y sEVs (Campello *et al.*, 2015).

Además, en el contexto de la diabetes y la obesidad se produce una alteración en el contenido de estas vesículas. Numerosas evidencias señalan el papel de las EVs procedentes del tejido adiposo, del hígado, de las células β pancreáticas y del endotelio, como posibles mediadores en la comunicación entre estos tejidos al transportar diferentes mediadores como adipoquinas, proteínas de señalización de la insulina, citoquinas proinflamatorias, miARNs, mARNs, factores de crecimiento, y enzimas, en su interior. Estas van a favorecer el mantenimiento y el desarrollo de la inflamación crónica y sistémica de bajo grado, así como la aparición de la resistencia a la insulina y la DM2 (Mallocci *et al.*, 2019; Noren Hooten y Evans, 2020). Todo ello, señala el papel potencial de

las EVs como biomarcadores de la diabetes, así como una estrecha participación en el desarrollo y establecimiento de estas enfermedades metabólicas.

Por ejemplo, estas EVs pueden participar en la inducción y el desarrollo de la resistencia a la insulina a través de diferentes procesos en el músculo, el tejido adiposo y el hígado. El primero de ellos es la activación de la inflamación, ya que en la obesidad se ha observado que las EVs procedentes del tejido adiposo contienen adiponectina o citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-6, y MCP-1. Estas vesículas indujeron la polarización de macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio M1 y favorecieron la aparición de resistencia a la insulina en adipocitos, hepatocitos y miocitos (Kranendonk *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha descrito que las EVs procedentes de macrófagos M1 pueden ser internalizadas por los adipocitos y disminuir la expresión e impedir la translocación de GLUT-4 a la membrana, favoreciendo la resistencia a la insulina (Zhang *et al.*, 2015). Por último, se ha observado que bajo condiciones de hiperglucemia las EVs derivadas de hepatocitos contienen grandes cantidades de las enzimas calpaína y secretasa- γ , que van a actuar en los propios hepatocitos degradando el receptor de la insulina e impidiendo su señalización, favoreciendo el desarrollo de la resistencia a la insulina y la aparición de DM2 (Yuasa *et al.*, 2016).

3. Vesículas extracelulares y vasculopatía diabética

Los primeros estudios llevados a cabo por Nomura y Sabatier describieron el posible papel de las vesículas en el progreso y desarrollo de la aterosclerosis en pacientes diabéticos. Se observó un incremento de los niveles de vesículas derivadas de plaquetas, con modificaciones en su contenido y una mayor actividad procoagulante en IEVs de pacientes con DM1 (Nomura *et al.*, 1995; Sabatier *et al.*, 2002). Recientemente, diversos estudios han demostrado que las EVs pueden tener un papel importante en el desarrollo temprano de la macrovasculopatía diabética, estando implicadas en diferentes procesos de la lesión aterosclerótica, como la disfunción endotelial, el estrés oxidativo, la

inflamación, la trombosis, y la calcificación, a través de su capacidad para interactuar con las células vasculares, y gracias a sus propiedades procoagulantes, proinflamatorias y proangiogénicas (Zhou *et al.*, 2019).

Como se ha indicado anteriormente, la diabetes es un factor de riesgo en la aparición temprana y el desarrollo de la aterosclerosis. Diversas evidencias señalan un papel de las EVs en el desarrollo de la DE, uno de los primeros fenómenos que precede a la aterosclerosis. La acumulación de LDL y su oxidación en la lesión aterosclerótica, así como una alteración de las relajaciones dependientes de endotelio, están relacionados con una mayor liberación de EVs endoteliales, así como con una alteración de su contenido y sus funciones fisiológicas. Además, en diferentes estudios se ha observado que las IEVs de leucocitos, plaquetas y de células endoteliales se acumulan en la lesión y pueden contribuir a la disfunción endotelial disminuyendo la actividad de la eNOS y la consecuente producción de NO, a la vez que incrementan los niveles de ROS a través del transporte de la NOX (Brodsky *et al.*, 2004; Flamant y Tamarat, 2016). Este mecanismo se confirmó en modelos animales, en los que la administración de estas EVs empeoró la relajación dependiente de endotelio (Fu *et al.*, 2015). Otros mecanismos descritos en la literatura implican el transporte de miARNs y de ARNs no codificantes a través de sEVs que afectarían a la capacidad angiogénica del endotelio (Wang *et al.*, 2014).

Estudios *in vitro* han demostrado que las EVs derivadas de leucocitos, células endoteliales y plaquetas en la lesión aterosclerótica son capaces también de promover un incremento de la adhesión de monocitos en el endotelio, a través de la expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1. Además, algunos miARNs transportados en EVs van a incrementar la liberación de citoquinas inflamatorias en el tejido adiposo perivascular y la polarización de macrófagos a un fenotipo M1 proinflamatorio (Agouni *et al.*, 2011; Flamant y Tamarat, 2016; Zheng *et al.*, 2017). Además de estos procesos, numerosos estudios señalan el papel de las EVs en la comunicación intercelular entre el endotelio y el músculo liso vascular. Se ha observado que las EVs procedentes del endotelio y de las células espumosas presentes en la placa aterosclerótica favorecen la proliferación y migración del músculo liso, a través del transporte de varios miARNs y la

activación de vías de señalización como ERK1/2 y Akt, favoreciendo la formación de la capa neointima, el estrechamiento de la luz del vaso y el remodelado vascular (Hergenreider *et al.*, 2012; Niu *et al.*, 2016). Cabe destacar el papel de las EVs derivadas del músculo liso vascular en este último proceso de calcificación de la lesión, el cual, es un predictor de riesgo cardiovascular. En este caso, diferentes estudios *in vitro* sugieren el papel de estas EVs en la mineralización y en la inducción de un fenotipo osteogénico del músculo. De hecho, las EVs derivadas del músculo liso vascular presentaban un alto contenido en mediadores capaces de afectar a la expresión de genes osteogénicos, como RUNX-2, los cuales van a favorecer el proceso de calcificación (Fig. 15) (Kapustin *et al.*, 2011; Kapustin y Shanahan, 2016; Krohn *et al.*, 2016).

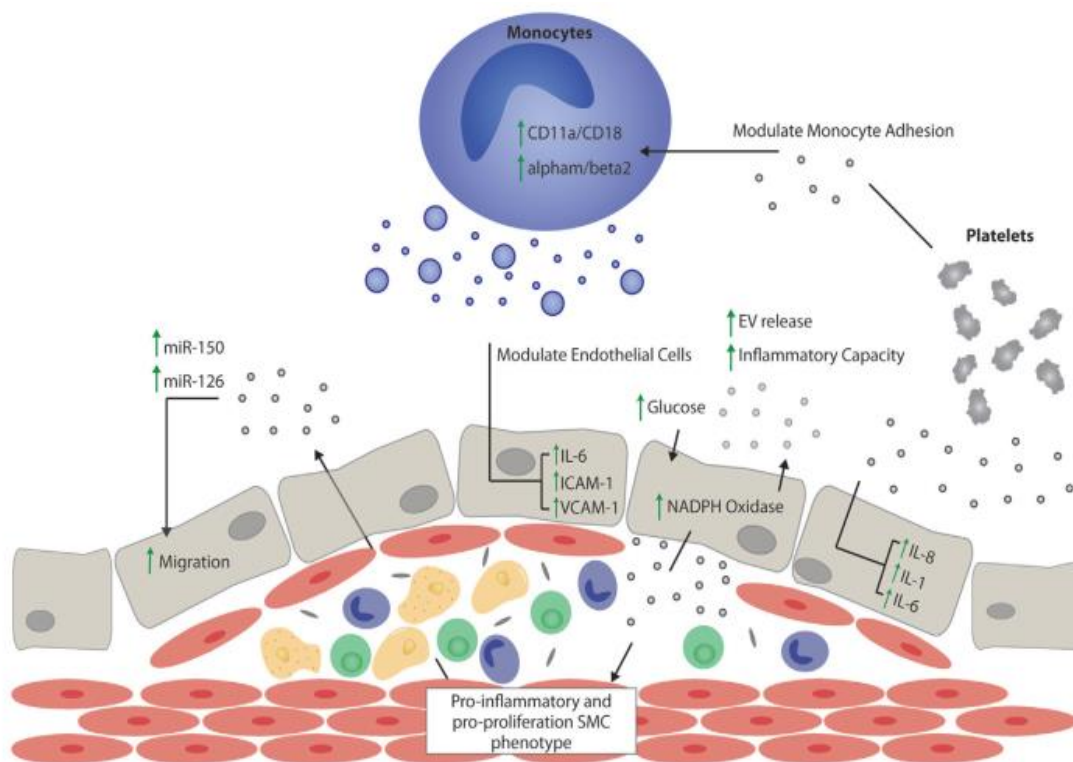


Figura 15. Participación de las EVs en la inflamación, trombosis y disfunción endotelial, en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Representación esquemática de los potenciales efectos proaterogénicos de las EVs, centrándose en sus papeles en la inflamación, trombosis y DE en el proceso aterosclerótico (Gustafson *et al.*, 2017).

4. Vesículas extracelulares, NLRP3 e IL-1 β

Como se ha indicado anteriormente, diferentes estudios señalan la capacidad de las EVs para transportar citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 o TNF α en condiciones patológicas, independientemente de su origen (Milbank *et al.*, 2015; Hosseinkhani *et al.*, 2018). Este modo de transporte permite que las citoquinas mantengan su actividad biológica hasta interaccionar con las células diana. Además, el tamaño y las propiedades de las EVs les permiten cruzar barreras biológicas alcanzando diferentes órganos y sistemas, por lo que representan una importante vía de señalización intercelular en diferentes procesos fisiológicos. Este tipo de transporte de citoquinas se ha descrito en experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, y engloba a prácticamente todas las citoquinas existentes. Asimismo, el perfil de citoquinas transportadas por las EVs sufre cambios en respuesta a estímulos y a condiciones patológicas. De hecho, el contenido de citoquinas en EVs se ha visto incrementado en pacientes diabéticos, viéndose incrementado el contenido de citoquinas de estas EVs con el desarrollo de la diabetes (Tokarz *et al.*, 2015; Fitzgerald *et al.*, 2018).

Las EVs liberadas en la respuesta inflamatoria, ya sea en patologías inflamatorias, u otras patologías con un fuerte componente inflamatorio, como la artritis, la diabetes o en la enfermedad de Alzheimer, promueven la inflamación de células endoteliales, neutrófilos, hepatocitos, monocitos y macrófagos a través de varios mecanismos, entre los que se encuentran la liberación de las citoquinas inflamatorias y componentes del inflamasoma, la activación de receptores y la inducción de mediadores inflamatorios. De hecho, algunos estudios sugieren una relación entre el inflamasoma NLRP3 y la secreción de IL-1 β en vesículas extracelulares (Qu *et al.*, 2007; van Hezel *et al.*, 2017; Cypriak *et al.*, 2018). Se han descrito numerosos activadores del inflamasoma NLRP3 y que, a su vez, incrementan la producción y secreción de EVs. Entre ellos destacan el ATP y toxinas microbianas como la nigericina y el LPS, que a través de la activación del receptor P2X7 favorece la salida de iones K⁺ y la entrada de Ca²⁺ al interior celular, lo que a su vez activa proteínas implicadas en la producción y liberación de EVs como la calpaína (Välimäki *et al.*, 2016; Kalra *et al.*, 2016). Otro de los activadores son los cristales de urato y colesterol, los

cuales producen el daño y rotura de los lisosomas, induciendo la activación del inflammasoma NLRP3 y de las catepsinas, implicadas en la producción de EVs (Rintahaka *et al.*, 2011). Por último, algunas evidencias señalan que la propia caspasa-1 podría intervenir en la secreción de EVs. De hecho, se ha propuesto que la activación de la caspasa-1 es crucial para el secuestro del *speck* de ASC y de otros componentes del inflammasoma NLRP3 en el interior de las EVs (Wang *et al.*, 2016).

En conjunto, estos estudios demuestran la capacidad de las EVs procedentes de células del sistema inmune para transportar la IL-1 β , su precursor la pro-IL-1 β , y el resto de componentes del inflammasoma NLRP3 hasta otras células permitiendo la propagación paracrina e incluso endocrina de la respuesta inflamatoria (Fig. 16). Consecuentemente, esto supone la existencia de una estrecha relación entre la activación del inflammasoma NLRP3, y la liberación de EVs, lo que la convierte en una potencial diana farmacológica para el abordaje de la inflamación en diferentes patologías, como la diabetes y sus complicaciones vasculares asociadas.

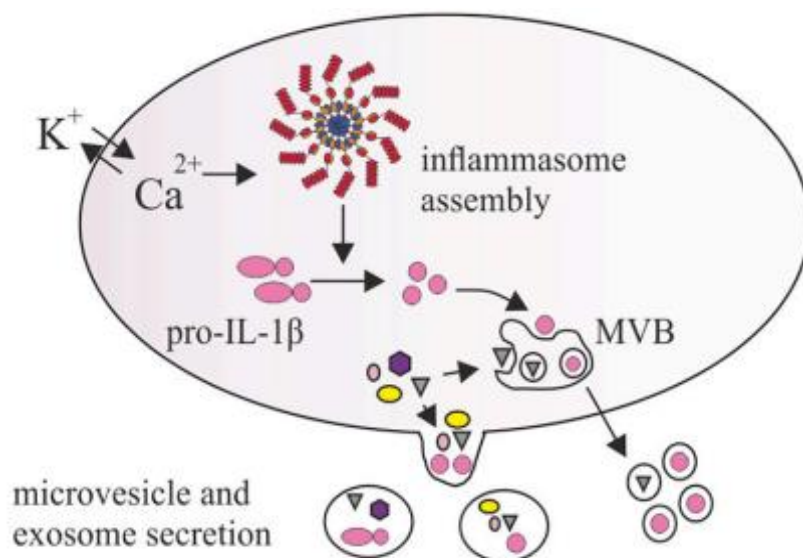


Figura 16. Empaquetamiento y transporte de los componentes del inflammasoma NLRP3 y la IL-1 β en vesículas extracelulares. Algunos activadores, y mecanismos de activación del inflammasoma NLRP3, están implicados en procesos de formación de EVs, lo cual, permitiría el secuestro de algunos de los componentes del inflammasoma en el interior de dichas EVs (Cypryk *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

La inflamación es un proceso determinante en la fisiopatología de enfermedades cardiometabólicas como la obesidad y la DM, y presenta un papel central en la aparición y el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas a estas patologías. En este sentido y, como se ha descrito anteriormente, uno de los grandes efectores de la inflamación en la vasculatura es el eje del inflammasoma NLRP3 y la interleuquina IL-1 β . Algunas evidencias recientes entre las que destaca el ensayo CANTOS, han señalado a la IL-1 β como un potencial agente causal en la vasculopatía diabética. Además, la disponibilidad y el uso de nuevos fármacos biológicos, como anakinra y canakinumab, enfatizan el potencial de esta citoquina como diana terapéutica en la vasculopatía diabética. Por otro lado, existen pocos datos acerca del papel de las EVs liberadas por el músculo liso vascular en las patologías vasculares, si bien la mayoría de ellas señalan la importancia de estas vesículas en los procesos de calcificación y trombosis en el contexto de la aterosclerosis. Esto apunta a las EVs como posibles mediadores de señalización que puedan favorecer el mantenimiento y el desarrollo de la inflamación crónica y sistémica de bajo grado en la enfermedad vascular.

El objetivo global de este trabajo fue estudiar nuevos mecanismos implicados en la sinergia proinflamatoria que se produce entre la IL-1 β y las concentraciones elevadas de glucosa extracelular en el músculo liso vascular, con especial atención a la implicación del inflammasoma NLRP3, a la propia IL-1 β , así como en el perfil secretor de las vesículas extracelulares liberadas por el músculo liso vascular.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar si la IL-1 β puede ejercer un efecto inflamatorio sobre las células de músculo liso vascular humano (CMLVH) *in vitro* y analizar si este efecto proinflamatorio se potencia en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. En especial, analizar la capacidad de la IL-1 β y la glucosa para activar el inflammasoma NLRP3, sus componentes, y la consecuente formación de IL-1 β .

2. Analizar el perfil secretor de las vesículas extracelulares liberadas por las CMLVH *in vitro*, y estudiar los cambios en el mismo tras los tratamientos con IL-1 β y/o elevadas concentraciones de glucosa, identificando, además, la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 en estas vesículas.
3. Analizar si el bloqueo farmacológico de la IL-1 β mediante el uso del antagonista del receptor IL-1R, anakinra, es capaz de impedir tanto la activación del inflamasoma NLRP3, como los cambios en el perfil secretor de las vesículas liberadas por las CMLVH, también en condiciones de elevadas concentraciones de glucosa.
4. Estudiar si las vesículas extracelulares secretadas por las CMLVH estimuladas con IL-1 β y/o elevadas concentraciones glucosa son capaces de ejercer algún efecto proinflamatorio de manera autocrina y paracrina, sobre el propio músculo liso vascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE CULTIVOS CELULARES

1. Células de músculo liso vascular de aorta humano (CMLVH)

Los cultivos de músculo liso utilizados en esta tesis son una línea celular primaria de músculo liso vascular humano que se estableció en el laboratorio en el año 2008. Su obtención se llevó a cabo mediante la disociación enzimática de los fragmentos de aorta procedentes del Hospital Universitario de Getafe y obtenidos de cinco donantes de órganos, cuya media de edad era de 35 años (35 ± 5.6 años), ninguno de ellos presentaba antecedentes médicos ni evidencia clínica de enfermedad cardiovascular, diabetes u obesidad. Las donaciones se llevaron a cabo siguiendo la regulación legal española, y el estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Getafe (CEIC 14/17).

El método para su obtención consistió en un lavado previo de los fragmentos aórticos con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril, compuesta de 0.2 g de KCL, 0.2 g de KH_2PO_4 , 8 g de NaCl y 1.144 g de Na_2HPO_4 (todos procedentes de Panreac Química; España) para eliminar los posibles restos de grasa y coágulos. Posteriormente, se eliminaron la capa adventicia y el endotelio mediante métodos mecánicos de corte y raspado suave de la luz del vaso. Los fragmentos de aorta se cortaron cuidadosamente y fueron sometidos a digestión enzimática incubándose con colagenasa tipo II (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich; EE.UU.) diluida en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Biological Industries; Israel), suplementado con 0.1% de seroalbúmina bovina (BSA), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomina y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (Sigma Aldrich; EE.UU.) (medio DMEM 0.1% BSA). La incubación se realizó en una estufa húmeda con una atmósfera al 95% de O_2 y 5% de CO_2 , a 37°C durante 90 minutos. A continuación, la suspensión celular se sometió a una centrifugación de 1.000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió y se lavó dos veces con DMEM 0.1% BSA repitiendo el proceso de las centrifugaciones. Tras la última centrifugación, las células se resuspendieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) (Biological Industries;

Israel), además de la glutamina y los antibióticos mencionados previamente (medio DMEM 10% FCS). Las células se sembraron en frascos de cultivo en medio DMEM 10% FCS, en una estufa a 37°C con 5% de CO₂ (Romacho *et al.*, 2009).

Para la realización de los experimentos, una vez establecidos los cultivos de músculo liso vascular, el medio DMEM 10% FCS se renovó cada 48 horas hasta que se alcanzó la confluencia. Para los experimentos posteriores, las células se resuspendieron mediante tripsinización, usando una solución de tripsina 0.05% y ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA) 0.02% (Biological Industries; EE.UU.), y se sembraron a la densidad celular y en los soportes óptimos para cada experimento. En los experimentos llevados a cabo en esta tesis se utilizaron cultivos de CMLVH con un rango de pases entre 8 y 18. Tras alcanzar una confluencia del 80-90%, las células CMLVH fueron privadas de suero (ayuno) incubándose con medio DMEM 0,1% BSA durante las 24 horas previas a los diferentes tratamientos. Tras este ayuno, las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos en medio fresco DMEM 0.1% BSA durante los tiempos requeridos para cada experimento (Romacho *et al.*, 2009).

WESTERN BLOT

Los niveles de expresión de las proteínas especificadas en esta tesis se cuantificaron mediante la técnica de Western Blot (WB) (Peiró *et al.*, 2003). Las CMLVH fueron sembradas en placas de Petri de 60mm de diámetro y cultivadas según el protocolo de cultivo descrito anteriormente.

1. Extracción de las muestras

Tras los diferentes tratamientos, se llevó a cabo la extracción de las proteínas celulares mediante métodos químicos y mecánicos. Primero se retiró el medio DMEM 0,1% BSA y se lavaron las células dos veces con PBS a 4°C. Tras el último lavado, se añadieron 75 µL de tampón de lisis, formado por una solución 25 mM de Tris (pH 7,9), 0,5 mM de EDTA y los inhibidores de proteasas, 0,5 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 12,5 µg/mL de aprotinina y 10 mM de ortovanadato sódico (todos procedentes de Sigma-Aldrich; EE.UU.), y se dejó actuar durante 10 minutos en hielo. A continuación, se usaron rascadores para ayudar de forma mecánica a la lisis de las células, recogiendo el lisado celular en tubos eppendorf y dejándolos en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto a 4°C, tras la centrifugación se recogió el sobrenadante con las proteínas y se descartó el precipitado con los restos celulares. La concentración proteica de estos lisados se cuantificó mediante el método colorimétrico del ácido bicincónico (BCA), tal y como se describe a continuación, y las muestras se almacenaron a -20° C.

2. Determinación de la concentración proteica por el método del BCA

El método del ácido bicincónico o BCA, es un método colorimétrico que permite determinar la concentración de proteína presente en una solución. Este método se basa en la reacción de Biuret, por la que la magnitud de la reducción de iones Cu^{2+} a Cu^{+} en un medio alcalino es proporcional a la cantidad de las proteínas presentes. A continuación, los iones Cu^{+} reaccionan con el ácido bicincónico formando un complejo de color violeta, cuya absorbancia se determina a una longitud de onda de 562 nm.

La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos con un kit comercial (Pierce™ BCA™, ThermoFisher; EE.UU.). Se tomaron 5 µL de cada muestra y 5 µL de H_2O por pocillo. En doce pocillos se realizó una curva patrón con concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina BSA (0-2 mg/mL).

Posteriormente se añadieron 200 μ L por pocillo de la mezcla de reactivos comerciales y se incubó la placa a 37°C, en oscuridad durante 30 minutos. Por último, se analizó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA (ELx800 reader, Biotek instruments). La concentración proteica de las muestras se determinó mediante extrapolación con los datos de absorbancia obtenidos en la curva patrón de BSA.

3. Electroforesis y transferencia

La separación de las proteínas, una vez obtenidas y cuantificadas, se llevó a cabo mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida de una concentración entre el 10% y el 15% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), sometiendo las muestras a una corriente eléctrica de entre 90-140 V. Para ello se tomaron 15-20 μ g de proteína diluida en tampón de carga (Laemli) 4X, formado por 125 mM de Tris, 2% de dodecil sulfato sódico (SDS), 5% de glicerol, 1% de β -mercaptoetanol y 0,025% de azul de bromofenol, (Sigma-Aldrich; EE.UU.), y se hirvieron los extractos a 97°C durante 5 minutos.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas según su peso molecular, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o de nitrocelulosa (Merck; Alemania), con un tamaño de poro de 0,45 μ m de diámetro, mediante el uso de un campo eléctrico constante de 350 mA de intensidad durante 3 horas.

4. Bloqueo e incubación con anticuerpos

Una vez se realizó la transferencia de las proteínas, se llevó a cabo el bloqueo de la membrana para impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos que se utilizaron posteriormente. Para ello se incubó la membrana con una solución salina formada por Tris 0,01 M (pH 7,5), NaCl 0,1 M y Tween 20 al 0,01% (Sigma-Aldrich; EE.UU.) (TBS-T) con leche en polvo desnatada o BSA al 5% dependiendo de la proteína de interés, durante 1 hora a temperatura

ambiente y en agitación. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios y en las condiciones especificadas en la tabla 1. Tras los diferentes tiempos de incubación, las membranas se lavaron sucesivamente tres veces con TBS-T en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, específicos para los anticuerpos primarios empleados en las condiciones especificadas en la tabla 2. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-T.

Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios empleados para WB y sus protocolos de incubación correspondientes.

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
NLRP3	1:1.000	Ratón	12 h	4°C	Adipogen Life Sciences (EE.UU.)
ASC	1:1.000	Conejo	12 h	4°C	ENZO (EE.UU.)
iNOS	1:1.000	Ratón	12 h	4°C	BD Bioscience (EE.UU.)
P_p65	1:1.000	Conejo	12 h	4°C	Cell signaling (EE.UU.)
Pro-IL-1 β	1:1.000	Cabra	2 h	RT	R&D Systems (EE.UU.)
IL-1 β activa	1:1.000	Conejo	12 h	4°C	Cell signaling (EE.UU.)
Caspasa-1 activa	1:1.000	Conejo	12 h	4°C	GenTex (EE.UU.)
PKM 2	1:1.000	Conejo	12 h	4°C	GenTex (EE.UU.)
HIF1 α	1:1.000	Ratón	12 h	4°C	BD Bioscience (EE.UU.)

Tabla 2. Características de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) empleados para WB y sus protocolos de incubación correspondientes.

Anticuerpo secundario-HRP	Dilución	Diluyente	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
IgG Anti-ratón	1:10.000	TBS-T	Cabra	1 h	RT	Millipore (EE.UU.)
IgG Anti-conejo	1:10.000	TBS-T	Cabra	1 h	RT	Bio-Rad (EE.UU.)
IgG Anti-cabra	1:10.000	TBS-T	Burro	1 h	RT	Bethyl Lab. (EE.UU.)

5. Detección de la proteína de interés

La detección de las bandas inmunorreactivas se llevó a cabo usando un kit comercial de quimioluminiscencia por luminol "Clarity Max™ ECL Substrate (Bio-Rad; EE.UU.), el cual gracias a la acción de la peroxidasa produce la emisión de luz, captándose esta mediante el uso de un analizador de imagen (Chemidoc™ XRS System, Bio-Rad; EE.UU.) acoplado a un ordenador. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo por densitometría utilizando el programa NIH Image J. Por último, cada membrana se reincubó con un anticuerpo monoclonal frente a β -actina (Sigma-Aldrich; EE.UU.) utilizada como control de carga. Todo el proceso del WB queda resumido y representado en la figura 17.

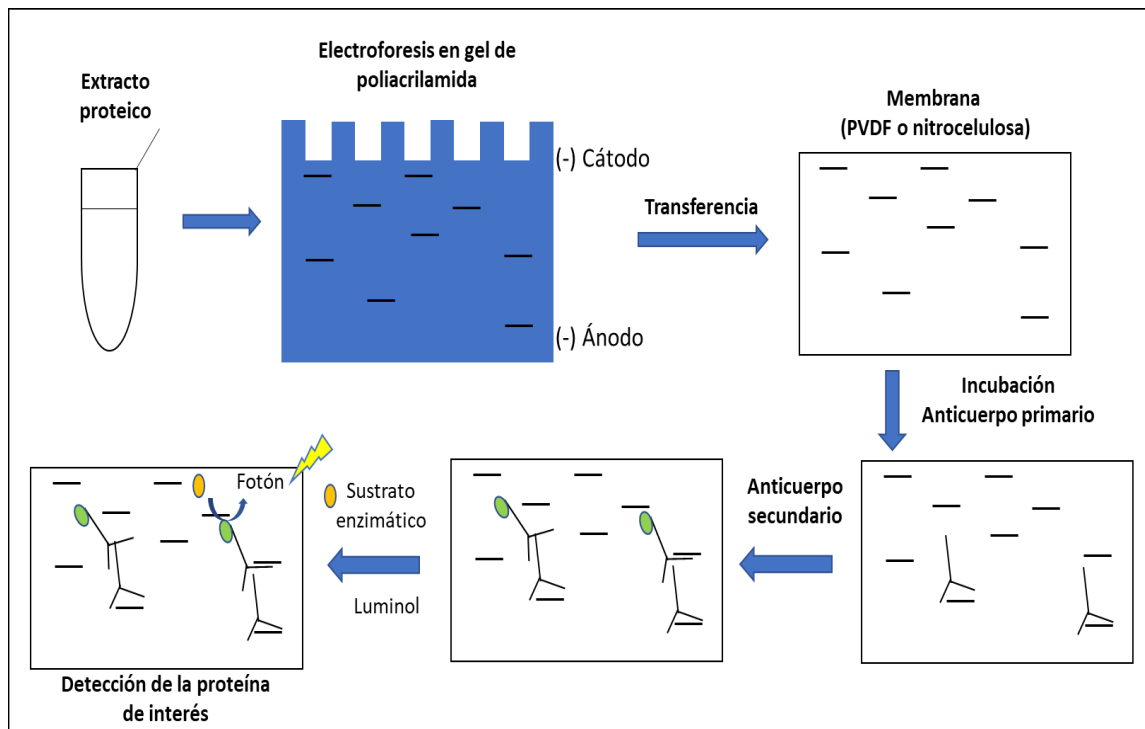


Figura 17. Imagen esquemática de la técnica de WB. Las proteínas de lisados celulares se separan mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en función de sus pesos moleculares. A continuación, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Para la detección de la proteína de interés la membrana se incuba con un anticuerpo primario frente a dicha proteína, al que a su vez se une un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Mediante el uso de un kit comercial (ECL) la HRP transforma el luminol en luz que es captada por un analizador de imagen.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica inmunoquímica que permite la detección y la localización de una gran variedad de proteínas y antígenos en diferentes tipos de preparaciones celulares o tisulares. Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos específicos frente a proteínas de interés. La IF puede ser directa o indirecta, en el caso de la IF directa, el anticuerpo primario frente a la proteína de interés es conjugado con un fluoróforo fluorescente. Sin embargo, en el caso de la IF indirecta se requieren dos pasos de incubación, en la primera incubación se utiliza un anticuerpo primario frente a la proteína de interés, mientras que en la segunda se emplea un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo que reconoce específicamente la región constante del anticuerpo primario utilizado. La IF indirecta (usada en esta tesis), aunque es más lenta que la directa, permite una mayor sensibilidad y una mayor amplificación de la señal, así como detectar varias proteínas en una misma muestra. Posteriormente, mediante el uso de un microscopio de fluorescencia, las moléculas fluorescentes conjugadas con los anticuerpos son excitadas por unas longitudes de onda específicas, produciendo una emisión de fluorescencia a otra longitud de onda, la cual es detectada por el microscopio (Im *et al.*, 2018).

1. Visualización de agregados de ASC mediante microscopía confocal

Las CMLVH se sembraron en placas de 8 pocillos especiales para microscopía confocal con una densidad de 60.000 células por pocillo y se dejaron crecer en medio DMEM 10% FCS durante 24 horas. Una vez finalizados el ayuno y los tratamientos correspondientes, se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la visualización de la proteína ASC y su agregación formando complejos esféricos perinucleares (*specks*), que reflejan la activación del inflamasoma.

Primero, se retiró el medio DMEM 0,1% BSA lavando los cultivos dos veces con PBS suavemente para evitar la pérdida de células, y seguidamente las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se repitieron los lavados con PBS y se procedió a la permeabilización y bloqueo para permitir la entrada de los anticuerpos al interior celular y evitar las uniones inespecíficas de estos, respectivamente. Para ello, las células se incubaron con una solución de bloqueo formada por PBS con 1% de seroalbúmina bovina y Tritón X-100 al 0,1%, durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el bloqueo y las células se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de ratón frente ASC (Santa Cruz Biotechnology, SC-514414) diluido 1:50 en la solución de bloqueo anterior, durante 12 horas a 4°C.

En dos de los pocillos se llevaron a cabo los controles negativos de la técnica en la que las células fueron incubadas con solución de bloqueo sin anticuerpo primario o sin anticuerpo secundario, respectivamente. Este procedimiento permite determinar que la fluorescencia que se observará al final es debida a la unión específica de ambos anticuerpos, y no al posible fondo fluorescente que pudiesen generar el anticuerpo primario o los fluorocromos de los anticuerpos secundarios.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a realizar tres lavados de las células con PBS, eliminando el excedente de anticuerpo primario no adherido. Se continuó con la incubación del anticuerpo secundario específico frente a ratón (IgG), que presenta unido un fluorocromo de isocianato de fluoresceína (FITC), durante una hora, protegido de la luz, y con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el excedente de anticuerpo secundario y se añadió una solución de montaje con 4,6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl (DAPI) disuelto para permitir la visualización de los núcleos celulares, puesto que este compuesto tiene afinidad por el ADN y emite fluorescencia a una longitud de onda de 570 nm (Romacho *et al.*, 2020).

La obtención y visualización de las imágenes se llevó a cabo a través de la técnica de microscopía confocal, en la cual, la muestra es excitada por la incidencia de un láser que, a su vez, va a emitir una luz fluorescente cuya longitud

de onda es mayor que la de excitación. Esto permite, mediante el uso de un fotomultiplicador el estudio de muestras con un marcaje fluorescente haciendo secciones ópticas de las mismas. En esta tesis las preparaciones se analizaron captando las imágenes en un microscopio confocal Zeiss, modelo LSM 710. Para cada condición se tomaron de entre 10 y 15 imágenes en secciones de planos aleatorios empleando un objetivo 40X. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas utilizando la herramienta de cuantificación del programa NIH Image J, en el que se cuantificó el número total de agregados de ASC y se estableció una proporción de células con complejos de ASC frente a las células totales para cada condición.

AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CMLVH.

En la literatura hay descritos diferentes métodos y técnicas para el aislamiento de EVs en base a diferentes criterios biofísicos y bioquímicos, como el tamaño, la densidad, la forma, carga y exposición antigénica en la superficie. Estos incluyen centrifugación diferencial, centrifugaciones en gradientes de densidad, cromatografía por exclusión de tamaño, ultrafiltración, etc. (Mallocci *et al.*, 2019). Sin embargo, el método más común usado actualmente se basa en sucesivas centrifugaciones graduales para eliminar los restos de células muertas y otros contaminantes procedentes de la lisis celular (Hulsmans y Holvoet, 2013), que es el que se usó en esta tesis.

1. Aislamiento de vesículas de gran tamaño (IEVs) o microvesículas

Las células se sembraron en frascos de cultivo T182 con DMEM 10% FCS hasta alcanzar la confluencia. Una vez finalizado el ayuno, las CMLVH se incubaron con los tratamientos correspondientes en 25 mL de medio DMEM 0,1% BSA por cada frasco, usándose dos frascos de cultivo por cada condición de tratamiento. Tras las 18 horas de tratamiento, se recogieron los medios

condicionados de los diferentes tratamientos en tubos estériles de 50 mL, juntándose aquellos de la misma condición y obteniendo un volumen final de 50 mL por cada condición de tratamiento. En estos tubos se llevó a cabo la primera centrifugación durante 15 minutos a 250 G con el objetivo de eliminar células muertas en suspensión y restos celulares de gran tamaño. Una vez terminada, se descartó el precipitado y se recogió el sobrenadante en nuevos tubos estériles de 50 mL, que se centrifugaron a 2.500 G durante 15 minutos, para eliminar los cuerpos apoptóticos y restos celulares de pequeño tamaño que pudiesen quedar en el medio. De nuevo, se descartó el precipitado y el sobrenadante se volvió a centrifugar durante 45 minutos a 17.000 G para obtener las IEVs. Tras este paso, el sobrenadante, que contiene las sEVs, se guardó en nevera a 4°C en tubos de 50 mL estériles para su posterior ultracentrifugación. El precipitado, que contiene las IEVs, se resuspendió en 2 mL de NaCl 0,9% estéril y se centrifugó de nuevo, con el objetivo de lavar las IEVs de restos del medio condicionado, a 17.000 G durante 45 minutos. Por último, se descartó el sobrenadante, y el precipitado de IEVs se resuspendió en 100 µL de NaCl y se guardó a 4°C hasta su posterior caracterización y análisis.

2. Aislamiento de vesículas de pequeño tamaño (sEVs) o exosomas

El sobrenadante procedente de la primera centrifugación a 17.000 G que contiene las sEVs, se llevó a tubos especiales de ultracentrifugación estériles (Beckman Coulter; EE.UU.), y se sometió a una primera ultracentrifugación a 200.000 G durante 2 horas, usando un rotor MLA-50 en una ultracentrífuga Optima MAX-XP de Beckman and Coulter. El precipitado, que contiene las sEVs, se resuspendió en 4 mL de PBS estéril y se ultracentrifugó de nuevo usando un rotor MLA-80 a 200.000 G durante 2 horas, con el objetivo de lavar las sEVs de restos del medio condicionado. Por último, se descartó el sobrenadante, y el precipitado de sEVs se resuspendió en 200 µL de PBS y se guardó a 4°C para su posterior caracterización y análisis.

En paralelo, las células CMLVH de las que proceden estas vesículas extracelulares fueron resuspendidas mediante tripsinización, y cuantificadas

mediante el uso de una cámara de Neubauer, con el objetivo de conocer el número exacto de células de las que procedían las vesículas extracelulares aisladas previamente.

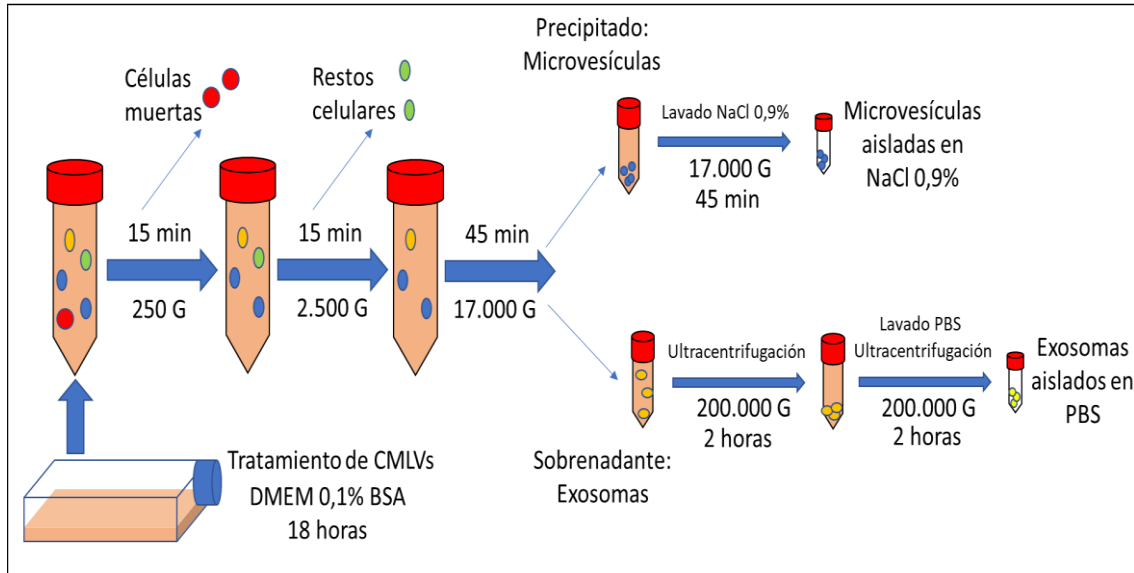


Figura 18. Imagen esquemática del procedimiento seguido para el aislamiento de las vesículas extracelulares procedentes de células de músculo liso vascular humano a través de centrifugaciones progresivas.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EVs DE CMLVH

1. Citometría de Flujo

El número de IEVs, así como la presencia de la proteína NLRP3 en las mismas, se determinó mediante la técnica de citometría de flujo. Esta técnica permite analizar múltiples parámetros de diferentes poblaciones suspendidas en una solución salina y se basa en el paso de las diferentes partículas en suspensión a través de un capilar, lo que permite que sobre cada partícula incida un haz de luz visible o diferentes láseres fluorescentes. La dispersión de la luz visible producida por la partícula da información acerca del tamaño y de la complejidad o granulosidad de la partícula de manera independiente a la fluorescencia. Sin embargo, las partículas pueden teñirse o marcarse mediante el uso de proteínas fluorescentes, diferentes tinciones, o anticuerpos conjugados

con fluoróforos. En este caso, al incidir un láser fluorescente sobre cada partícula, genera una fluorescencia a una longitud de onda determinada, la cual es detectada y analizada, generando información acerca de la composición bioquímica de estas partículas.

Para determinar la concentración de IEVs se tomaron 10 μL de cada muestra y 10 μL de “Flow-count” fluoro-esferas (Beckman Coulter; EE.UU.), formada por una solución que contiene unas microesferas con un tamaño conocido y de una concentración determinada. De esta manera el sistema de análisis del citómetro de flujo toma de referencia la concentración y el tamaño de estas microesferas para determinar el número de IEVs presente en cada muestra por microlitro. Los resultados se expresan como la proporción del número de IEVs totales de cada muestra, frente al número de millones de células CMLVH que produjeron dichas IEVs.

La presencia de la proteína NLRP3 en las IEVs se determinó mediante el uso de un marcaje fluorescente con anticuerpos. Para ello se tomaron 10 μL de cada muestra de IEVs, y se incubaron durante 15 minutos con paraformaldehído 2% para su fijación. Una vez fijadas, se realizó un lavado con PBS y se centrifugaron a 17.000 G durante 15 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 50 μL de saponina 0,1% durante 5 minutos para llevar a cabo la permeabilización de las membranas de las IEVs, permitiendo así la entrada de los anticuerpos. Tras la permeabilización, se añadió el anticuerpo primario de conejo frente a la proteína NLRP3 a una dilución 1:50 (Cell Signaling; EE.UU.), y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadió el anticuerpo secundario frente a conejo marcado con un fluorocromo DyL-Alexa Fluor 488 a una dilución 1:50 (Cell Signaling; EE.UU.) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 μL de “Flow-count” fluoro-esferas para permitir el conteo de las microvesículas. Por último, se diluyó la muestra hasta un volumen final de 200 μL en NaCl 0,9% y se analizaron en un citómetro de flujo 500 MPL System (Beckman Coulter; EE.UU.). Al mismo tiempo, y como control negativo, se llevó a cabo el mismo proceso con otros 10 μL de cada muestra, pero sin realizar la incubación con el anticuerpo primario para

determinar la fluorescencia de fondo que genera el fluorocromo del anticuerpo secundario.

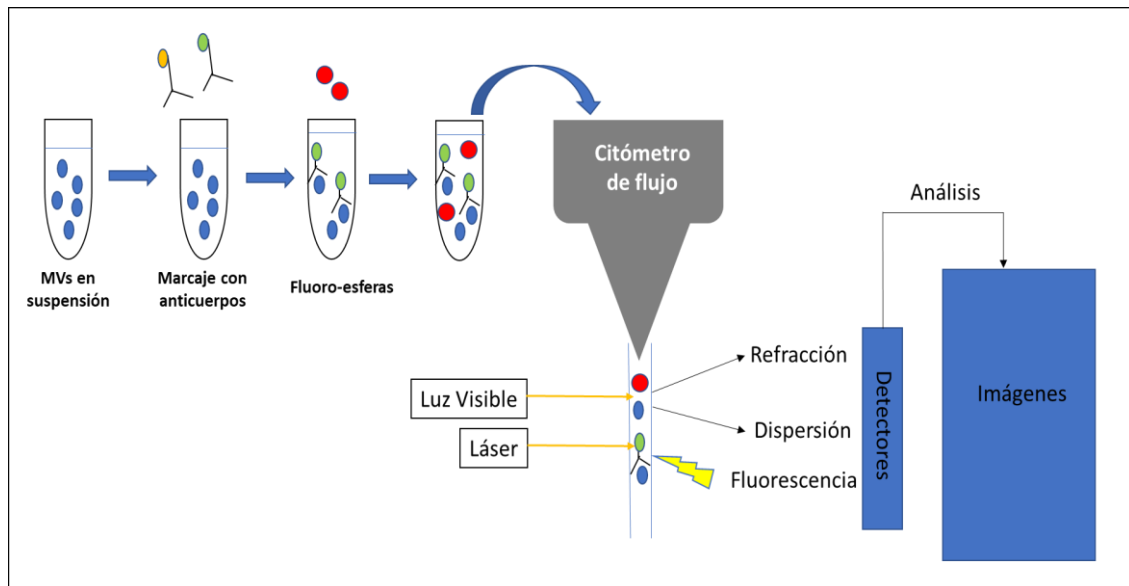


Figura 19. Imagen representativa del análisis de las IEVs mediante el uso de la citometría de flujo.

2. Análisis de seguimiento de nanopartículas “nanotracking”

El análisis de las sEVs en esta tesis se llevó a cabo usando el equipo NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipado con un láser de 405 nm de longitud de onda. Esta técnica se basa en la inyección de una suspensión de nanopartículas a través de un capilar y una membrana sobre la que incide un láser de luz. El sistema recoge los cambios en la dispersión y refracción de la luz que produce el paso de las nanopartículas, aportando información sobre el número de partículas en la solución y el tamaño de estas partículas (Distel y Ivanov, 2012).

Primero, se tomaron 10 μL de las muestras de sEVs y se realizó una dilución 1:100 en PBS estéril. Tras homogeneizar las muestras, el volumen final se cargó en jeringuillas de 1 mL que se usaron para inyectar la solución en el NanoSight. Durante el paso de las muestras, el sistema realizó cinco grabaciones de vídeo sucesivas de 90 segundos cada una. A continuación, los vídeos se analizaron mediante el programa “NTA software versión 3.2.” dando la

información del número de exosomas por microlitro, así como la media y la moda de sus tamaños. Durante todo este proceso, el sistema monitorizó automáticamente la temperatura en un rango de 20°C a 21°C, puesto que el aumento de la temperatura favorece la agregación de los exosomas, lo que impediría su cuantificación (Durcin *et al.*, 2017).

3. Western Blot

La identificación de las proteínas presentes en IEVs y sEVs se realizó mediante la técnica de WB, además de por citometría de flujo. La técnica se realizó usando el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, con la excepción del procedimiento para la preparación de las muestras.

Una vez aisladas las muestras de EVs, se tomaron 6 μ L de cada muestra y se diluyeron en 6 μ L de tampón de lisis, y se dejó incubar durante 15 minutos en hielo con el objetivo de destruir las membranas de las vesículas y liberar el contenido proteico total de las mismas. A continuación, se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método del BCA descrito anteriormente. A continuación, una vez conocida la concentración, se tomó el volumen de muestra correspondiente a 15 μ g de proteína y se repitió el proceso de lisis. Seguidamente, la muestra se diluyó en buffer Laemli 4X y se hirvió a 97°C, después se realizaron los mismos pasos del WB especificados en los apartados anteriores. Los anticuerpos utilizados para la caracterización y el análisis del contenido de las vesículas extracelulares se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Características de los anticuerpos empleados para la caracterización y el análisis de las vesículas extracelulares, y sus protocolos de incubación correspondientes.

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Tiempo	T (°C)	Casa comercial
NLRP3	1:1.000	Rata	12 horas	4°C	Cell Signaling (EE.UU.)
ASC	1:1.000	Ratón	12 horas	4°C	Santa Cruz Biotechnology (EE.UU.)
IL-1 β activa	1:1.000	Conejo	12 horas	4°C	Cell signaling (EE.UU.)
Caspasa-1 activa	1:1.000	Conejo	12 horas	4°C	Cell Signaling (EE.UU.)
β -Actina	1:5.000	Ratón	12 horas	4°C	Sigma-Aldrich (EE.UU.)
ALIX	1:1.000	Ratón	12 horas	4°C	BD Biosciences (EE.UU.)
CD81	1:500	Ratón	12 horas	4°C	Santa Cruz Biotechnology (EE.UU.)

MATERIALES

Todo el material de plástico estéril utilizado para la obtención, mantenimiento y experimentación de los cultivos celulares fue de Techno Plastic Products AG TPP (Suiza), aunque algunos soportes específicos como los utilizados en microscopía confocal fueron adquiridos en Ibidi (Alemania). Además de los reactivos y compuestos citados anteriormente, la IL-1 β fue suministrada por PeproTech (Reino Unido). Kineret© anakinra, el antagonista recombinante del receptor-1 de la IL-1 β , fue adquirido en Swedish Orphan Biovitrum AB (Sobi™, Suecia). El inhibidor de la activación del inflammasoma NLRP3, el MCC950 fue suministrado por Sigma-Aldrich (EE.UU.), así como el resto de reactivos, a menos que se especifique lo contrario.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM), siendo n el número de experimentos independientes realizados para cada gráfica. Los análisis estadísticos entre valores discretos se realizaron mediante el modelo de análisis de t de Student o análisis de varianza (ANOVA), en el caso de las curvas. Se consideró estadísticamente significativo aquel resultado con un valor de p inferior a 0,05 ($*p < 0.05$). Para la realización de las gráficas y los cálculos estadísticos se empleó el programa GraphPad Prism 8.0.

RESULTADOS

PARTE I

1. La IL-1 β induce la expresión de iNOS y la activación de NF- κ B en CMLVH: potenciación por D-glucosa a elevadas concentraciones

Como se ha descrito anteriormente, en estudios previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que un incremento de la concentración de D-glucosa no inducía *per se* la inflamación de las CMLVH *in vitro*. Sin embargo, la IL-1 β fue capaz de inducir dicha inflamación de manera concentración dependiente a través de la activación de NF- κ B y la inducción de la iNOS. Cabe destacar que estos efectos proinflamatorios se vieron exacerbados cuando la IL-1 β se incubó en presencia de elevadas concentraciones extracelulares de D-glucosa.

Para comprobar que estas células seguían respondiendo de la misma manera a la hora de realizar la presente tesis doctoral, las CMLVH se ayunaron y se expusieron a concentraciones crecientes de IL-1 β (1 a 20 ng/mL) en presencia o ausencia de elevadas concentraciones de D-glucosa (22 mM) durante 18 h. La concentración de D-glucosa basal en el medio de cultivo fue de 5,5 mM. A continuación, se cuantificó mediante WB la expresión de la proteína iNOS y de la forma activa de NF- κ B, la forma fosforilada de la subunidad p65 (p_p65), mediante WB. La IL-1 β aumentó los niveles de iNOS y de p_p65 de manera concentración dependiente, este aumento se vio potenciado cuando las CMLVH se trataron con las concentraciones crecientes de IL-1 β en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (22 mM), siendo esta potenciación significativamente estadística a partir de una concentración de IL-1 β de 10 ng/mL. Por otro lado, la elevación de la concentración de D-glucosa por sí misma no indujo cambios significativos en la expresión de ambas proteínas respecto de los niveles control (Fig. 20).

Esta concentración submáxima de IL-1 β de 10 ng/mL se utilizó en adelante para el resto de experimentos llevados a cabo en esta tesis, asimismo la concentración de 5,5 mM de D-glucosa será denominada como glucosa basal, y la concentración de 22 mM de D-glucosa será denominada como alta glucosa en los siguientes experimentos de esta tesis que se muestran a continuación.

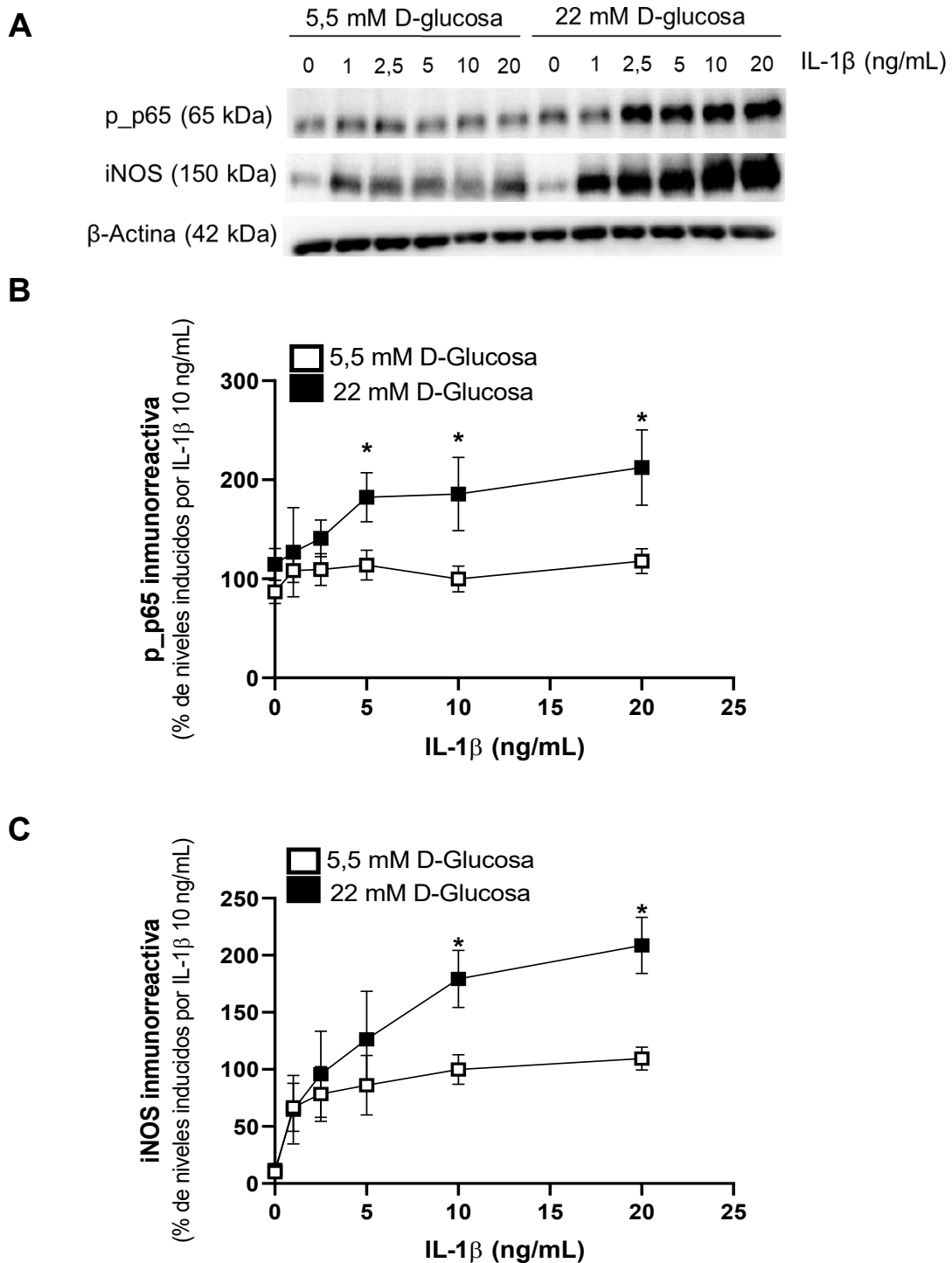


Figura 20. La D-glucosa potencia la activación de NF- κ B y la expresión de iNOS inducida por IL-1 β en CMLVH. Las CMLVH se expusieron a concentraciones crecientes de IL-1 β (1-20 ng/mL) en presencia o ausencia de elevadas concentraciones de D-glucosa (22 mM) durante 18h, para determinar la expresión de p_p65 e iNOS. **(A)** Geles representativos de la inducción de NF- κ B e iNOS por WB. **(B, C)** Cuantificación de los niveles de proteína inmunorreactiva. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción alcanzada por la IL-1 β a 10 ng/mL en condiciones de D-glucosa basal (5,5 mM), expresados como la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a la concentración correspondiente de IL-1 β

2. La IL-1 β induce la fase de cebado del inflamasoma NLRP3 que se potencia en alta glucosa

Una vez demostrada la capacidad de la IL-1 β (10 ng/mL) para inducir la activación de NF- κ B en CMLVH, y su potenciación bajo alta glucosa, se procedió a comprobar si la propia IL-1 β era capaz de inducir la fase cebado del inflamasoma NLRP3. Para ello, las CMLVH se trataron con IL-1 β (10 ng/mL) durante 18 horas en presencia o ausencia de alta glucosa, y se cuantificaron los niveles de expresión de la proteína NLRP3, la proteína accesoria ASC y la pro-IL-1 β , forma inmadura de la IL-1 β (Fig. 21, A). Los niveles de las proteínas NLRP3 y pro-IL-1 β se vieron incrementados significativamente por el tratamiento con IL-1 β (Fig. 21, C y D). Además, este incremento se vio exacerbado en presencia de alta glucosa, la cual no indujo ningún cambio en el perfil de expresión de estas proteínas por sí sola (Fig. 21, B). En cambio, los niveles de expresión de ASC no se vieron modificados por la acción de la citoquina o de la alta glucosa por sí solas, sin embargo, la combinación de ambas incrementó la expresión de esta proteína accesoria significativamente (Fig. 21, E).

3. La IL-1 β induce la fase de activación del inflamasoma NLRP3 que se potencia en alta glucosa

Tras confirmar la capacidad de la IL-1 β para inducir la fase de cebado del inflamasoma y la potenciación de la misma en alta glucosa, se analizó si estos estímulos eran suficientes para inducir la segunda fase de la activación del inflamasoma, que requiere la formación del *speck* de ASC, la consecuente activación de la caspasa-1, y finalmente la formación de IL-1 β madura.

Se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal para localizar los complejos de ASC, conocidos como *specks* en las CMLVH. Las células fueron incubadas con IL-1 β , en presencia o ausencia de alta glucosa durante 18 h. Los resultados obtenidos indicaron que la alta glucosa *per se* no era capaz de inducir la formación de estas estructuras.

Sin embargo, la IL-1 β (10 ng/mL) fue capaz de incrementar el número de células que presentaban estos complejos y, de nuevo, este número se vio significativamente incrementado con el tratamiento simultáneo de IL-1 β y alta glucosa (Fig. 22).

Por otra parte, se realizaron experimentos de WB para cuantificar los niveles de expresión de caspasa-1 activa (20 kDa), denominada caspasa-1 *cleaved* en inglés, y de IL-1 β madura (17 kDa). Se observó que la exposición a alta glucosa, por sí sola no era capaz de incrementar la expresión de estas isoformas, mientras que la IL-1 β (10 ng/mL) sí que indujo un incremento significativo en ambas proteínas, el cual, se vio significativamente potenciado por ambos estímulos de manera conjunta (Fig. 23).

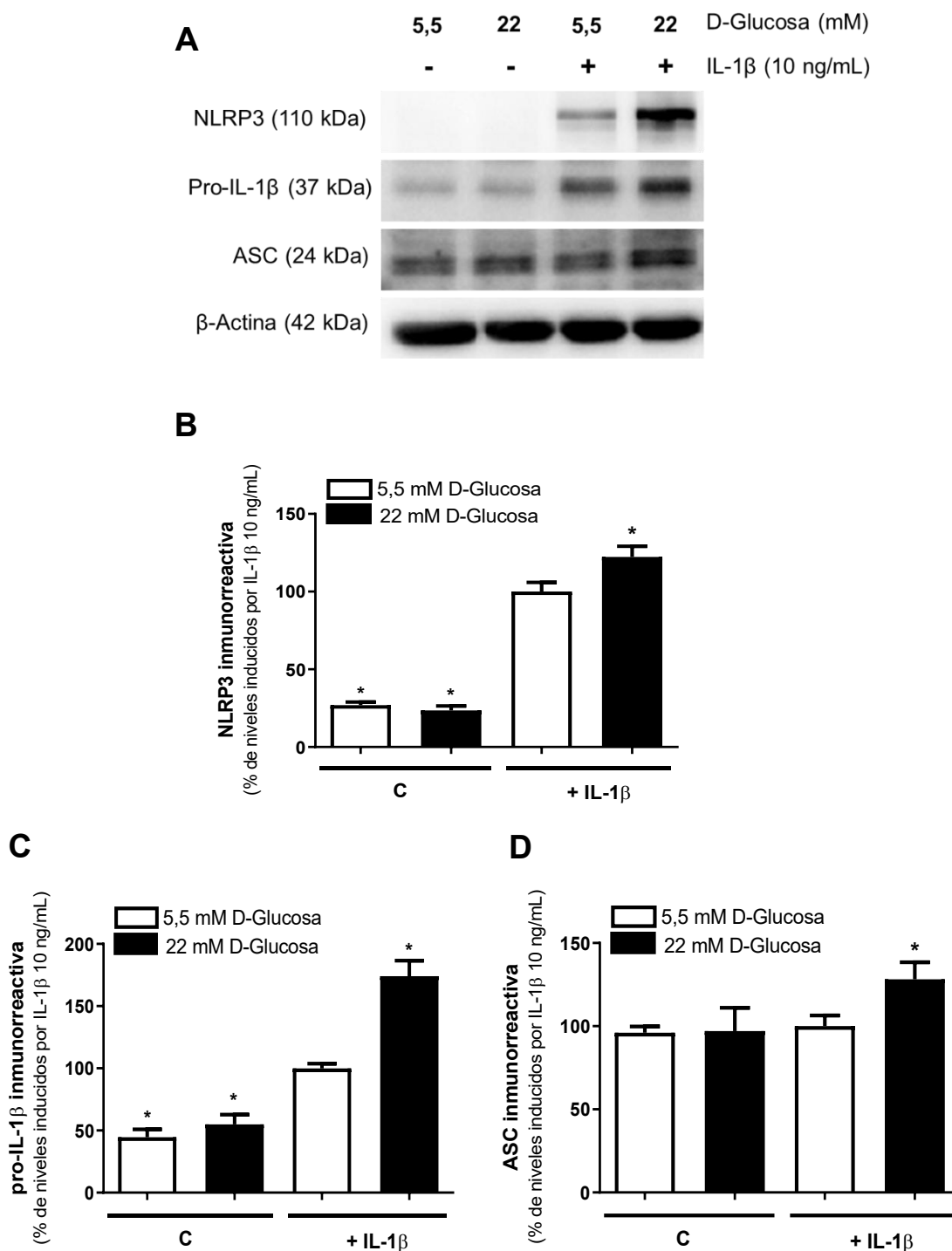


Figura 21. La IL-1 β induce la fase de cebado del inflammasoma NLRP3 que se potencia en alta glucosa (A) Geles representativos de la inducción de NLRP3, pro-IL-1 β , y ASC realizados mediante WB. Las CMLVH fueron expuestas a la IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o en presencia de alta glucosa durante 18 h y se determinó la expresión de **(B)** NLRP3, **(C)** pro-IL-1 β , y **(D)** ASC. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción alcanzada por la IL-1 β a 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de, al menos, cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

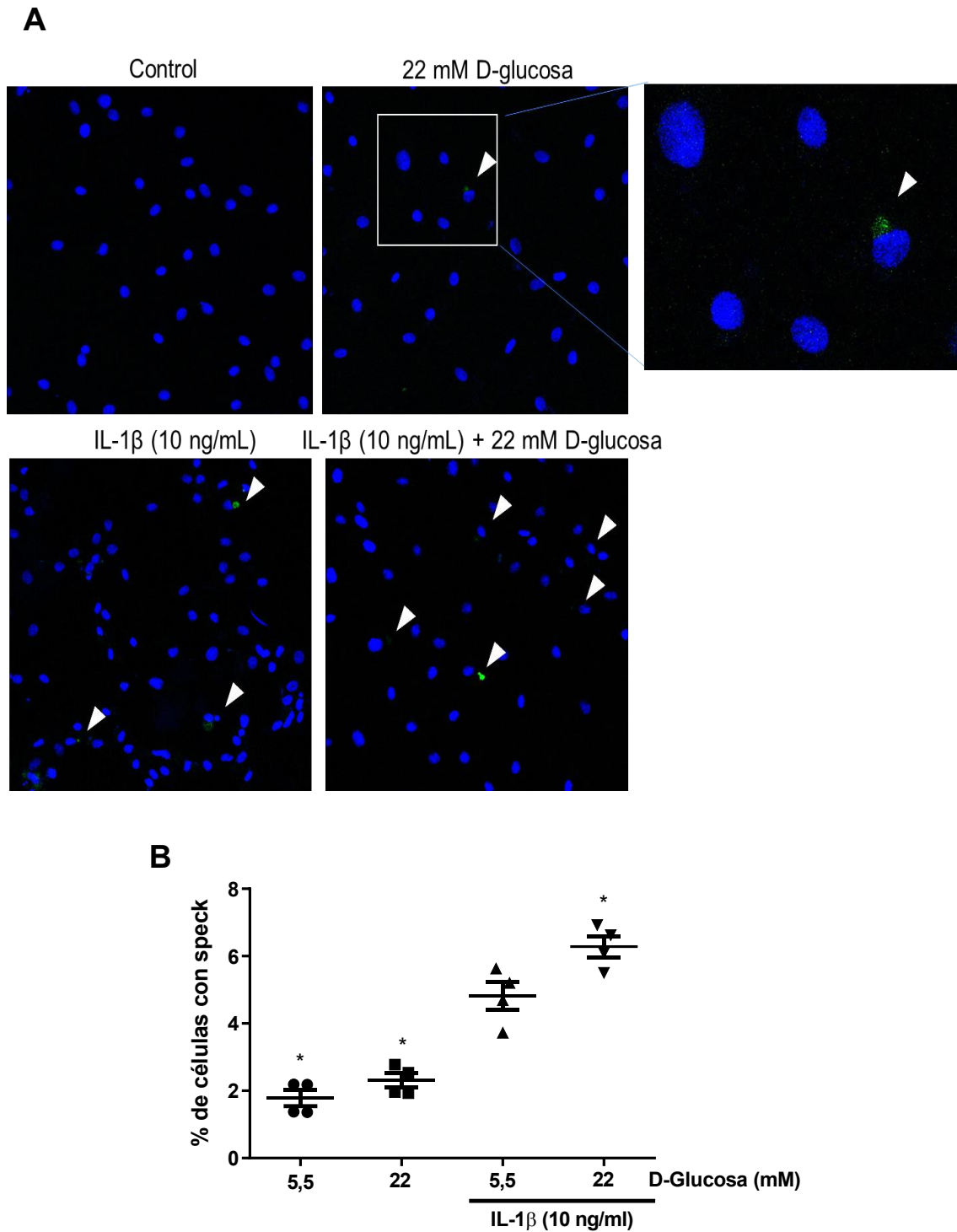


Figura 22. La IL-1 β induce la formación del *speck* de ASC que se potencia en alta glucosa. (A) Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de los complejos de proteína ASC (en verde) tomadas por microscopía confocal en las diferentes condiciones de tratamiento. Los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI (en azul). **(B)** Cuantificación del porcentaje de CMLVH que presentan *specks* en respuesta a los tratamientos indicados. Los resultados se presentan como el porcentaje de células con *speck* para cada tratamiento y se expresan como la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

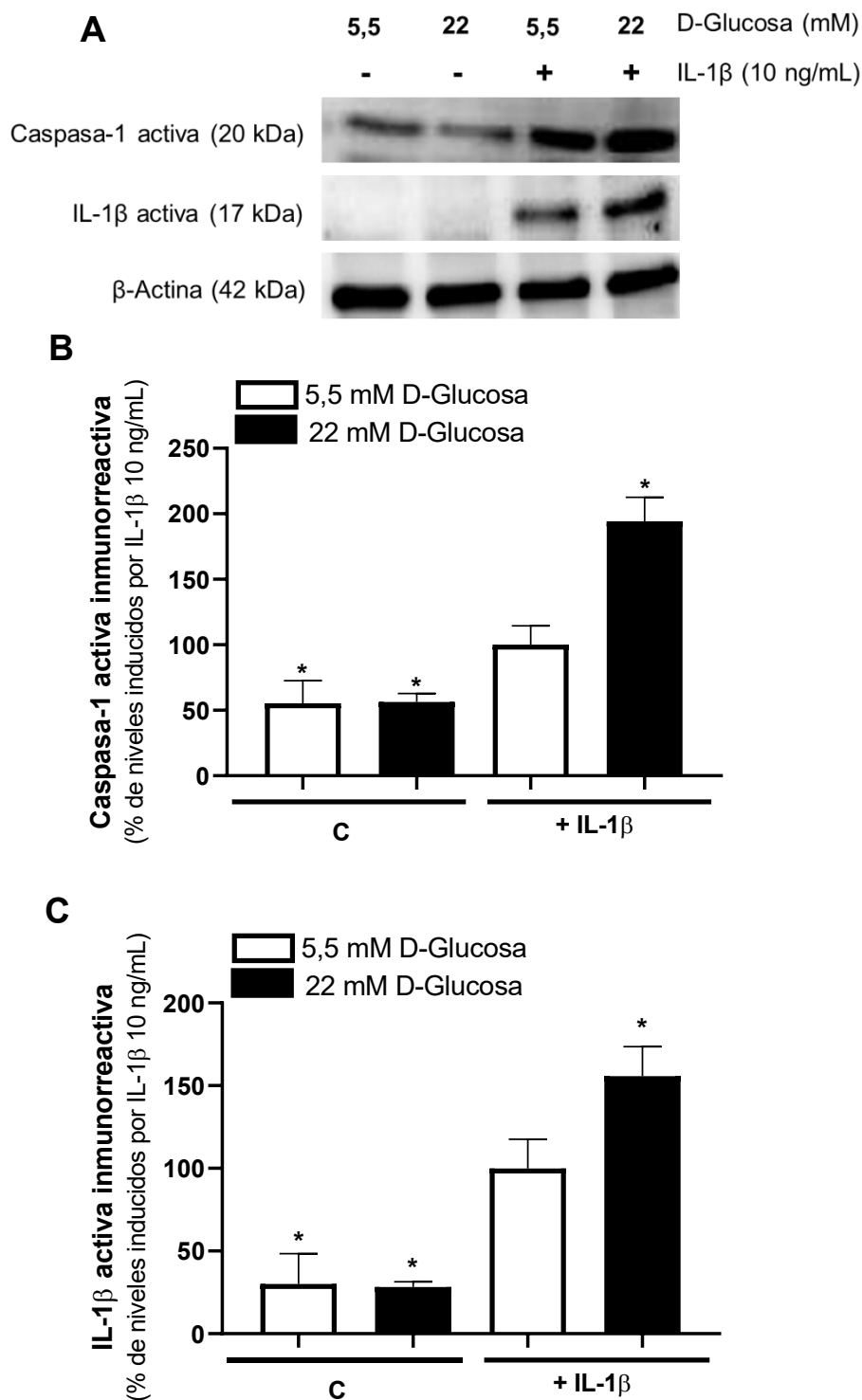


Figura 23. La IL-1 β induce la fase de activación del inflamasoma NLRP3 que se potencia en alta glucosa. (A) Geles representativos de la inducción de caspasa-1 e IL-1 β activas realizados mediante WB. Las CMLVH se expusieron durante 18 h a tratamiento con la IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa y se estudió la expresión de **(B)** la caspasa-1 activa, y **(C)** la IL-1 β activa. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción alcanzada por la IL-1 β a 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de, al menos, cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

4. La NADPH oxidasa interviene en el proceso de activación del inflammasoma NLRP3 y su potenciación en alta glucosa

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos principales que intervienen en la activación del inflammasoma NLRP3. Algunos estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio describieron que el efecto inflamatorio de la IL-1 β en CMLVH, así como la potenciación de estos efectos en presencia de alta glucosa, estaban mediados por una mayor actividad NADPH oxidasa, y una mayor producción de ROS en el músculo liso vascular (Peiró *et al.*, 2016). Por ello, quisimos comprobar si la inhibición de la actividad NOX podría reducir o prevenir la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por IL-1 β , así como su potenciación bajo altas concentraciones de D-glucosa.

Las CMLVH fueron preincubadas durante 30 minutos con apocinina (30 mM), inhibidor inespecífico de la actividad NOX, o con ML171 (0,5 μ M), inhibidor específico de la isoforma NOX1. A continuación, se trataron las células con IL-1 β (10 ng/mL) en presencia o ausencia de alta glucosa durante 18 h y se cuantificaron los niveles de expresión de la proteína IL-1 β activa (17 kDa) mediante WB. Los resultados indicaron que la inhibición de la actividad NOX por apocinina no logró prevenir el incremento de la expresión de la IL-1 β inducido por la propia citoquina, aunque lo redujo levemente, mientras que el fármaco ML171 sí consiguió prevenir dicho incremento de manera significativa. Por otro lado, ambos compuestos lograron inhibir completamente la potenciación en el incremento de los niveles de expresión de la IL-1 β inducidos por la citoquina bajo alta glucosa. Ninguno de los compuestos indujo cambios en los niveles de expresión de la citoquina madura *per se* o bajo alta glucosa (Fig. 24).

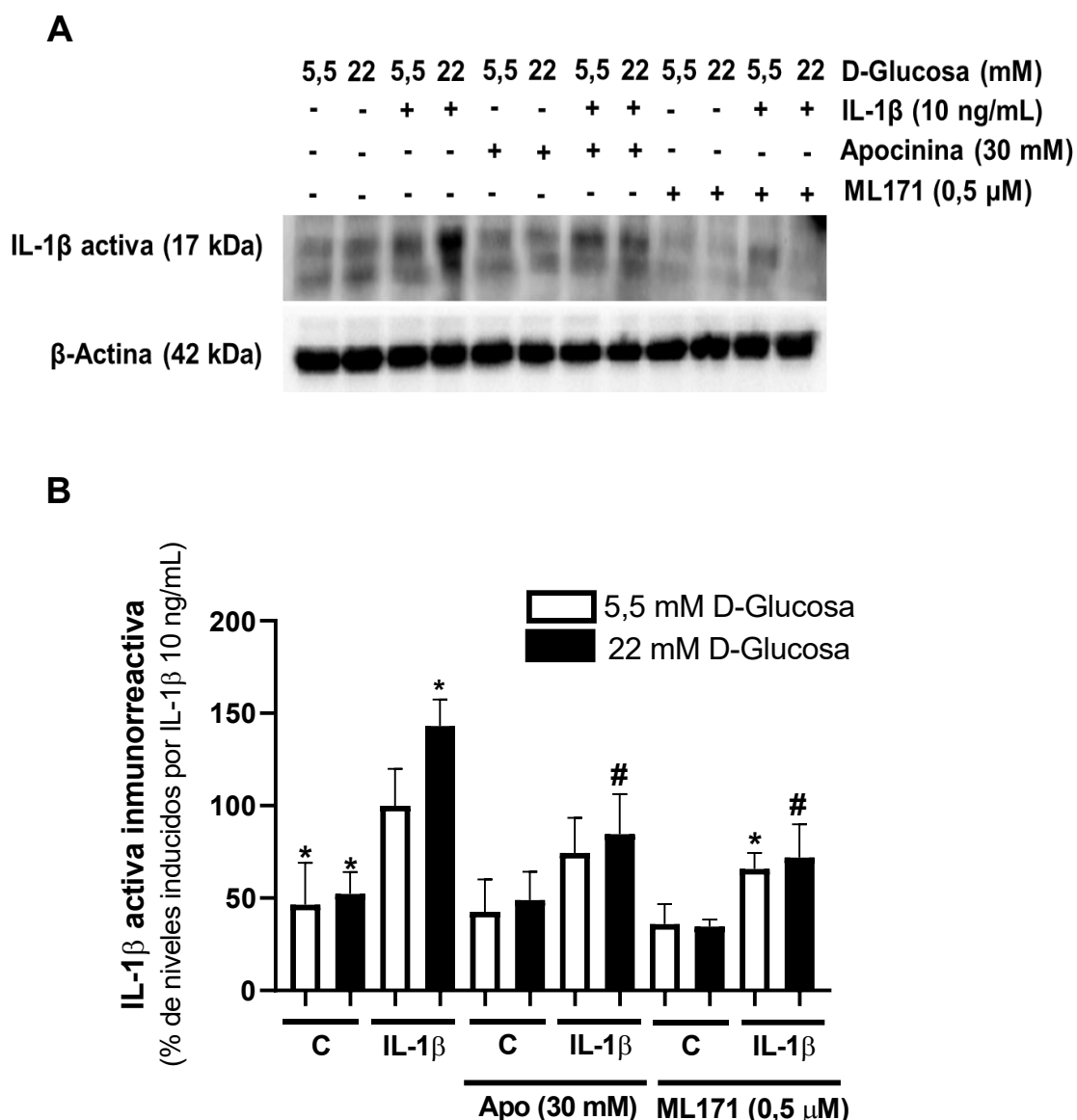


Figura 24. La NADPH oxidasa está implicada en la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la IL-1 β en CMLVH, así como en su potenciación en alta glucosa. **(A)** Geles representativos de la inducción de la expresión de la forma activa de IL-1 β en CMLVH expuestas a IL-1 β (10 ng/mL) y/o apocinina (30 mM) y ML171 (0,5 μ M), en presencia o ausencia de alta glucosa, realizados por WB. **(B)** Cuantificación de los niveles de IL-1 β activa inmunorreactiva. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción alcanzada por la IL-1 β a 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de, al menos, cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL); # $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM); (Apo: apocinina)

PARTE II

Si bien en la primera parte del trabajo se estudió la capacidad de la IL-1 β para inducir la activación del inflamasoma NLRP3, así como la alta glucosa era capaz de potenciar esta acción de la citoquina, la segunda parte se dedicó a estudiar y caracterizar el perfil secretor de las EVs liberadas por las CMLVH, y cómo la IL-1 β , en presencia o ausencia de alta glucosa, puede modificarlo.

1. La IL-1 β induce un cambio metabólico en las CMLVH incrementándose los niveles de PKM2 y HIF-1 α , que se potencian en alta glucosa

Algunos trabajos apuntan a la activación de la piruvato kinasa M2 (PKM2), otra enzima del metabolismo de la glucosa, y del factor de transcripción HIF1 α como un mecanismo importante en la activación del inflamasoma NLRP3 y de la producción de IL-1 β . Además, su activación se ha relacionado con la liberación de vesículas extracelulares. Por ello, quisimos analizar si el tratamiento con IL-1 β en presencia o ausencia de altas concentraciones de D-glucosa era capaz de modificar los niveles de expresión de estas proteínas en las CMLVH.

Las CMLVH fueron expuestas a IL-1 β (10 ng/mL) y/o alta glucosa durante 18 horas, y se determinaron los niveles de expresión de PKM2 y HIF1 α mediante WB. Los resultados obtenidos demostraron que la citoquina incrementaba los niveles de ambas proteínas y que este incremento se vio exacerbado cuando la citoquina se incubó bajo alta glucosa, mientras que la alta glucosa no modificó los niveles de expresión de HIF1 α por si sola, mientras que incrementó ligeramente los niveles de PKM2, aunque no de manera significativa, los niveles de expresión para esta proteína en las CMLVH (Fig. 25).

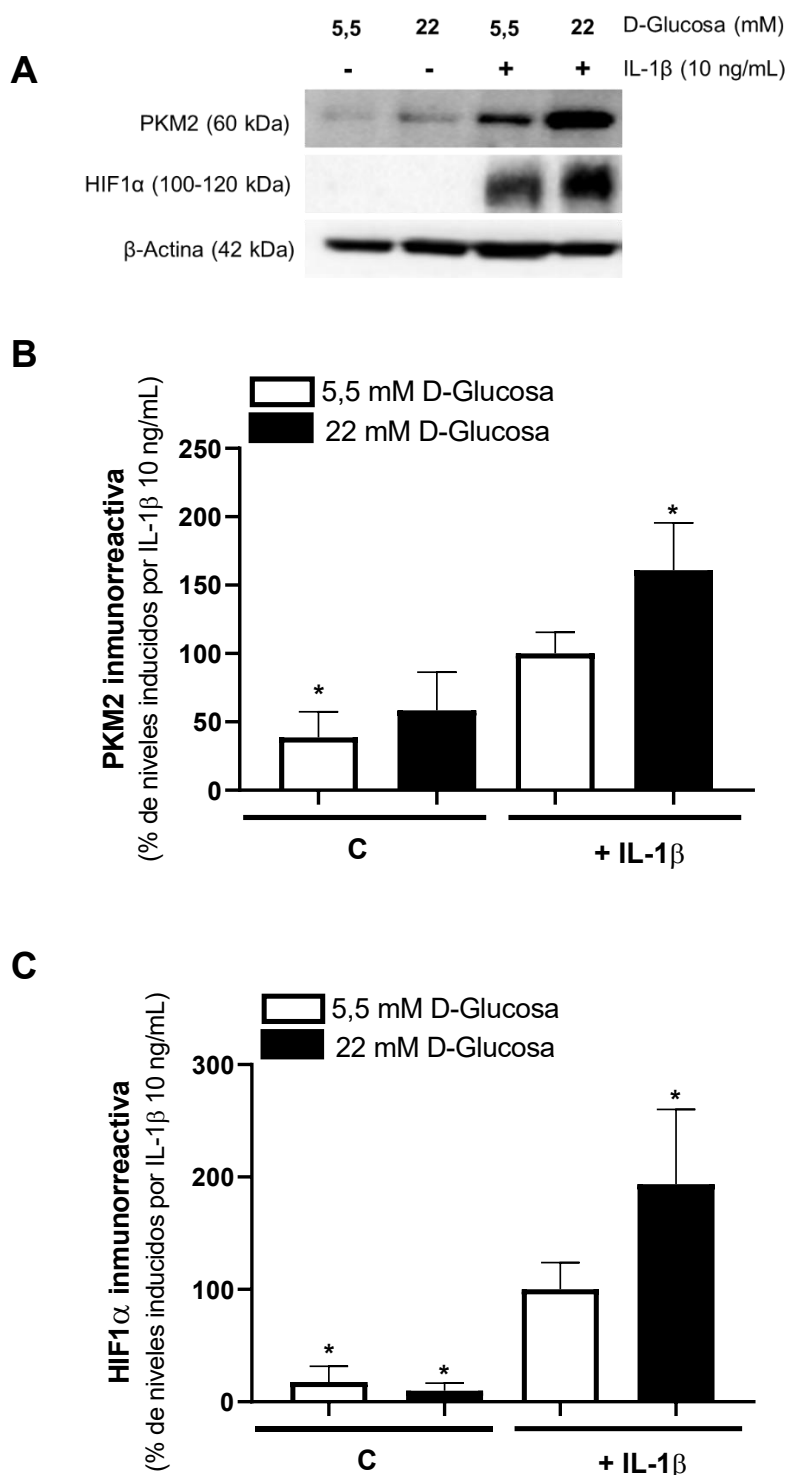


Figura 25. La IL-1 β incrementa la expresión de PKM2 y HIF1 α en CMLVH que se potencia en alta glucosa. Las CMLVH fueron expuestas a IL-1 β (10 ng/mL) durante 18 h en condiciones de glucosa basal o en alta glucosa. Posteriormente, se determinó la expresión de PKM2 y HIF1 α por WB (**A**) Geles representativos de la inducción de PKM2 y HIF1 α . Cuantificación de (**B**) PKM2, y (**C**) HIF1 α inmunorreactivas. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción por IL-1 β a 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de, al menos, cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

2. La IL-1 β induce la secreción de IEVs en CMLVH que se potencia en alta glucosa

Una vez confirmado que la IL-1 β era capaz de incrementar la expresión de PKM2 y HIF1 α , procedimos a estudiar el perfil secretor de las vesículas extracelulares liberadas por las CMLVH *in vitro* en respuesta a la citoquina.

Para ello, las CMLVH se expusieron al tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o en alta glucosa durante 18 h, para el posterior aislamiento de vesículas extracelulares y la caracterización de las IEVs secretadas. Los niveles basales de producción de IEVs fueron de 4.932 ± 1.797 IEVs por millón de células CMLVH. Los resultados indicaron que la IL-1 β indujo un efecto secretor en las CMLVH incrementando de manera significativa el número de IEVs producidas por millón de células. Además, este efecto secretor se vio altamente potenciado cuando la citoquina se incubó en alta glucosa observándose una liberación mucho mayor de IEVs por millón de CMLVH. Los niveles de IEVs liberadas bajo altas concentraciones de D-glucosa en ausencia de la IL-1 β no sufrieron cambios significativos respecto al número de IEVs liberadas por las células de manera basal (Fig. 26, A).

Asimismo, se realizaron experimentos de WB para confirmar la presencia de marcadores del citoesqueleto, como la β -actina, en estas vesículas. En todos los tratamientos indicados se pudo confirmar la presencia de esta proteína en las IEVs secretadas. Sin embargo, los niveles de producción de IEVs fueron tan bajos en las condicione control y de alta glucosa, que apenas se obtuvo proteína suficiente para poder realizar los experimentos requeridos y comparar entre los distintos tratamientos (Fig. 26, B).

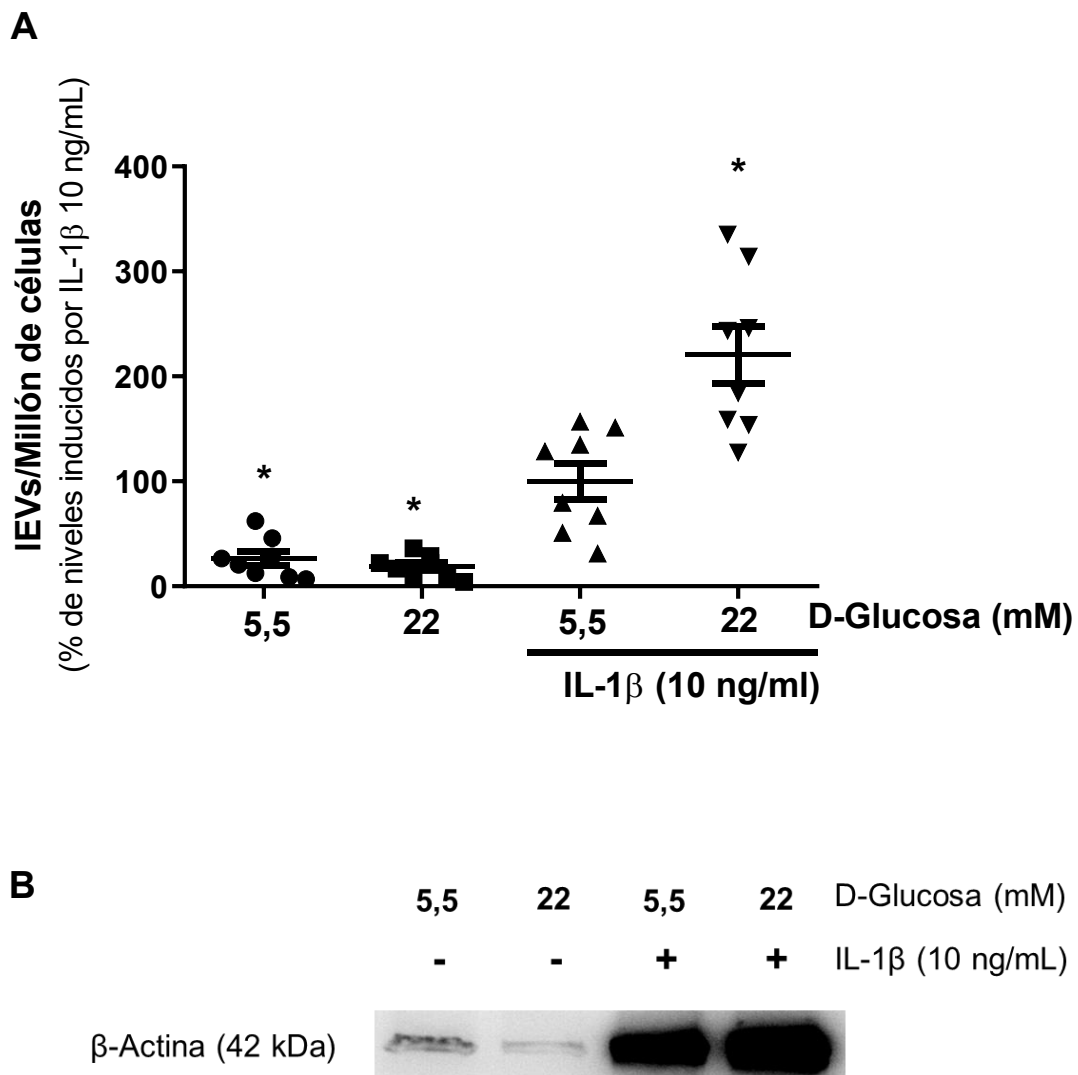


Figura 29. La IL-1 β induce el incremento en la liberación de IEVs en CMLVH que se potencia en alta glucosa. (A) Cuantificación del número de IEVs producidos por las CMLVH por citometría de flujo, en respuesta a los tratamientos indicados. Los resultados se presentan como porcentaje de IEVs por millón de células respecto de los niveles producidos en respuesta a IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de ocho experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL). **(B)** Gel representativo realizado por WB de la presencia de β -actina en las IEVs producidas por las CMLVH *in vitro* en respuesta al tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones glucosa basal o en presencia de alta glucosa durante 18 h.

3. La IL-1 β induce la secreción de sEVs en CMLVH que se potencia en alta glucosa

Posteriormente al aislamiento y caracterización de las IEVs, se llevó a cabo la caracterización de las sEVs mediante técnicas de “nanotracking” o seguimiento de nanopartículas para estudiar la concentración de sEVs producidas en cada condición experimental.

La exposición de las CMLVH a IL-1 β (10 ng/mL) durante 18 h en condiciones de glucosa basal incrementó de manera significativa el número de sEVs producidas por millón de células CMLVH, respecto de los niveles basales de producción. Este incremento se vio significativamente potenciado cuando la citoquina se incubó en alta glucosa observándose una liberación mucho mayor de sEVs por millón de CMLVH. La alta glucosa por sí misma no indujo ningún cambio en el número de las sEVs producidas por las CMLVH respecto a las sEVs liberadas por las células de manera basal (Fig. 27, B).

Asimismo, se realizaron experimentos de WB para comprobar la presencia de marcadores proteicos de sEVs, los cuales están implicados en la biogénesis de estas sEVs, como la tetraspanina CD81, y la proteína ALIX. Se observó que todas las sEVs procedentes de CMLVH presentaban dichos marcadores, independientemente del tratamiento al que se habían sometido las células (Fig. 27, A).

4. La IL-1 β induce una reducción del tamaño de las sEVs que se potencia en alta glucosa

Por otro lado, se observó que el tratamiento con la IL-1 β (10 ng/mL) inducía una disminución en el tamaño de las sEVs en comparación con las sEVs liberadas en la situación basal. Los resultados obtenidos de, al menos, cuatro experimentos independientes realizados, demostraron que la población de sEVs predominante o moda producida por las CMLVH no tratadas fue de $106,7 \pm 4,74$ nm, mientras que en las que provenían de células tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal, esta moda disminuyó a los $92,75 \pm 2,00$ nm.

Por último, el tratamiento de las CMLVH con IL-1 β (10 ng/mL) y alta glucosa indujo una disminución del tamaño de las sEVs más acentuada que la citoquina por sí sola disminuyendo el tamaño de la población predominante hasta $84,68 \pm 1,30$ nm. En este sentido, la alta glucosa por sí sola, no indujo ningún cambio significativo en el tamaño de las sEVs, cuya moda fue de $108,4 \pm 2,12$ nm. Este patrón de disminución de tamaño y su acentuación no solo se produjo en la población predominante o moda, sino que también se produjo en la media general del tamaño de las sEVs (Fig. 28, A y B).

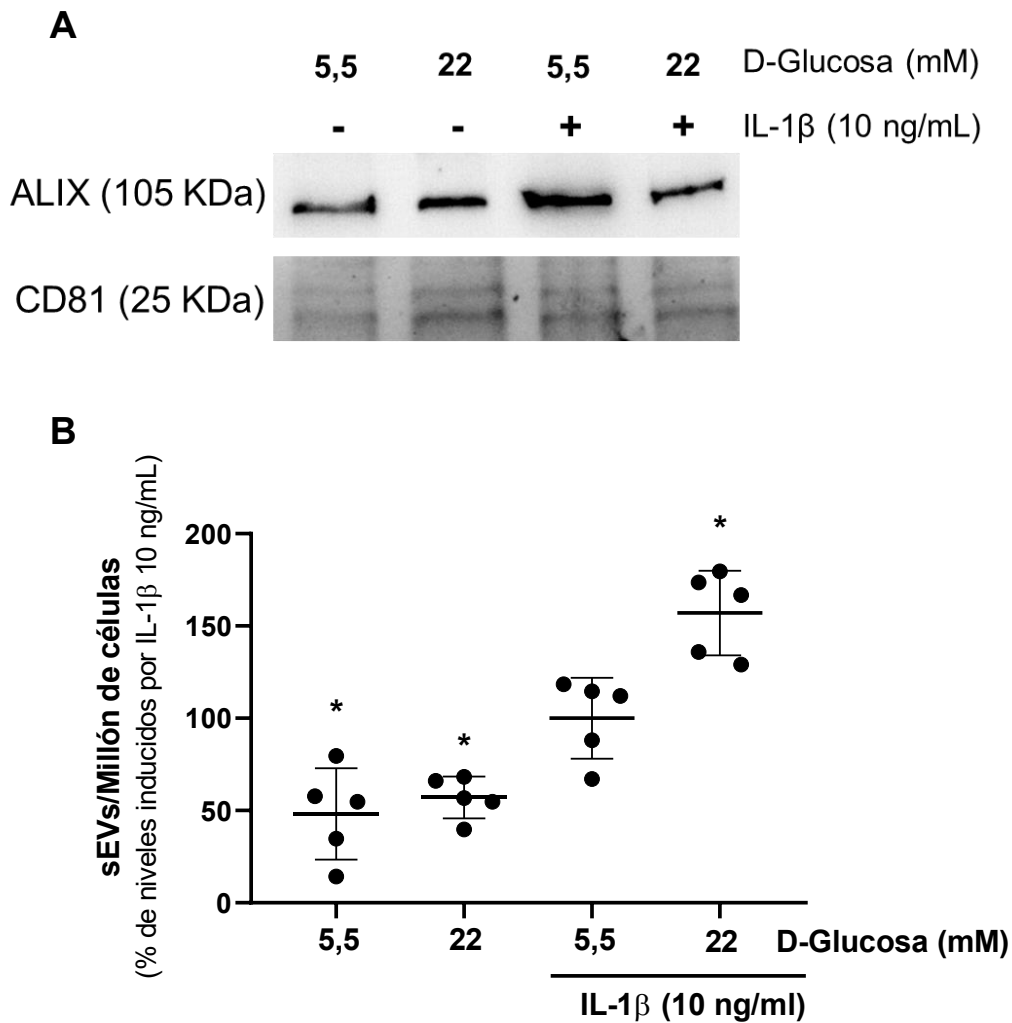


Figura 27. La IL-1 β induce un incremento en la liberación de sEVs en CMLVH que se potencia en alta glucosa. (A) Gel representativo de la presencia de CD81 y ALIX en las sEVs producidas por las CMLVH en respuesta al tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa. **(B)** Cuantificación por experimentos de “nanotracking” del número de sEVs producidas por las CMLVH en respuesta a los tratamientos indicados. Los resultados se presentan como el porcentaje de sEVs por millón de células respecto de los niveles producidos en respuesta a IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones glucosa basal, y se expresan como la media \pm EEM de al menos cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

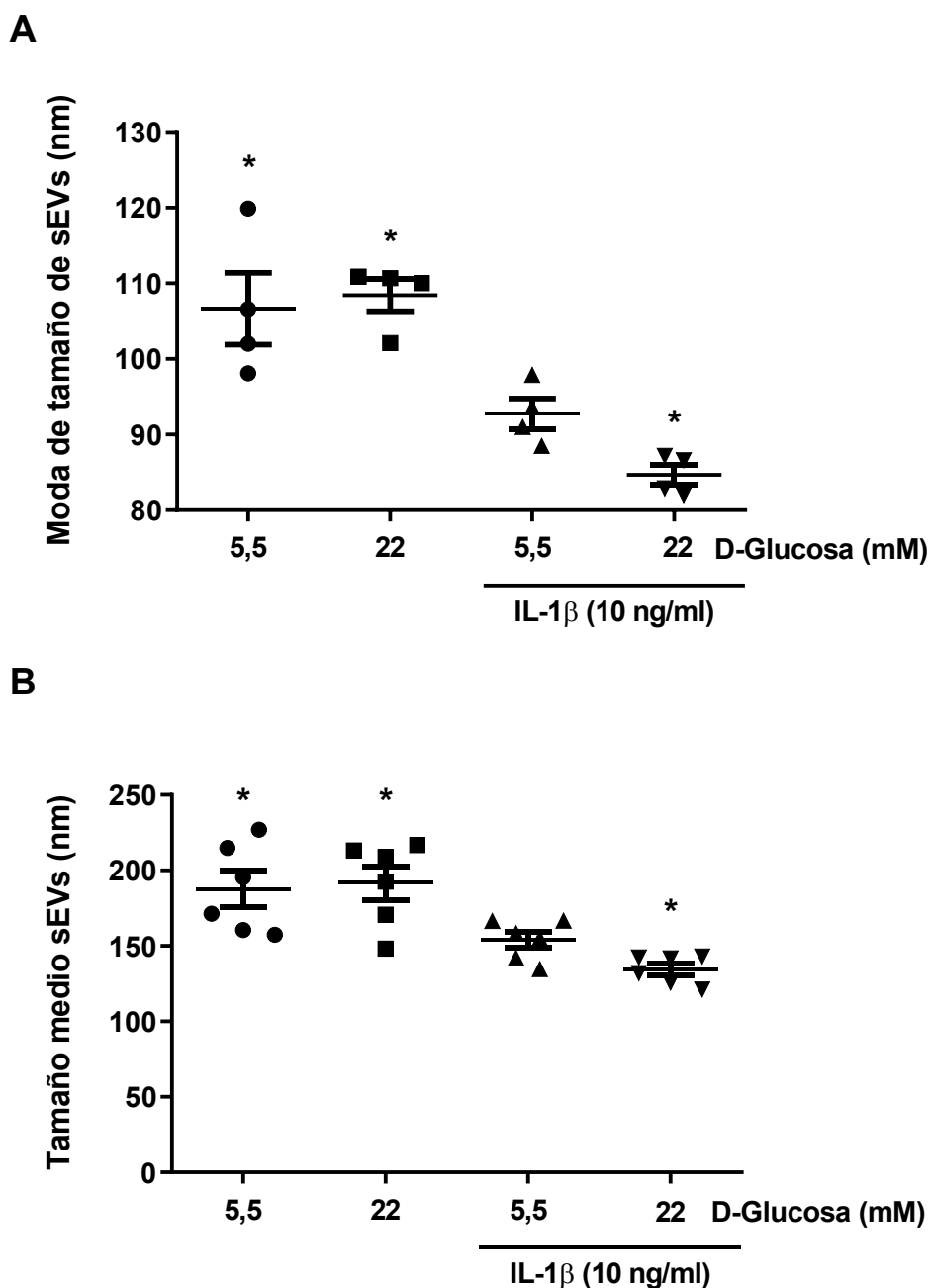


Figura 28. La IL-1 β induce una reducción del tamaño de las sEVs producidas por las CMLVH que se potencia en alta glucosa. Se emplearon técnicas de "nanotracking" o seguimiento de nanopartículas para determinar el tamaño de **(A)** la población predominante o moda y **(B)** de la población la general o media, de las sEVs producidas por las CMLVH en respuesta a los tratamientos indicados. Se presentan los datos como tamaño crudo en nanómetros (nm), expresados como la media \pm EEM de al menos cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

5. La IL-1 β induce la presencia de componentes del inflammasoma NLRP3 en contenido de las IEVs de CMLVH, que se potencia en alta glucosa

Quisimos comprobar si el tratamiento con IL-1 β y/o glucosa podía inducir cambios en el contenido de las IEVs producidas por las CMLVH, centrándonos en la capacidad de estas vesículas para transportar componentes del inflammasoma NLRP3, incluida la propia IL-1 β . Para ello, las IEVs producidas por las CMLVH en las diferentes condiciones de tratamiento fueron lisadas y su contenido proteico se analizó mediante técnicas de WB. El análisis se centró en la proteína NLRP3, la caspasa-1 activa y las formas activa e inactiva de la IL-1 β .

Los resultados indicaron que las IEVs procedentes de CMLVH en condiciones basales o de alta glucosa en ausencia de IL-1 β no presentaban estas proteínas. Sin embargo, el análisis de las IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en glucosa basal demostró la presencia de la proteína NLRP3, la caspasa-1 activa, y las formas activa e inactiva de la IL-1 β en estas IEVs. Respecto al estudio de las IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β en alta glucosa, se observó una potenciación en la presencia de estas proteínas respecto a la observada en las IEVs de CMLVH tratadas únicamente con la citoquina (Fig. 29, A)

Debido a la pequeña cantidad de IEVs aislada de las condiciones control y alta glucosa, la cantidad de proteína obtenida era muy pequeña, y en algunos casos no fue suficiente para la realización de los experimentos de WB. Por ello, para corroborar nuestros resultados anteriores las IEVs procedentes de las CMLVH fueron analizadas mediante técnicas de citometría de flujo para comprobar si la proteína NLRP3 se encontraba presente en estas vesículas y si el patrón anteriormente observado se repetía. Para ello, las IEVs de los diferentes tratamientos fueron permeabilizadas y marcadas con anticuerpos frente a la proteína NLRP3.

Los resultados observados indicaron cómo las IEVs NLRP3 positivas (+) se vieron incrementadas en aquellas poblaciones de IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL). Este incremento se vio exacerbado de forma significativa cuando las IEVs procedían de células tratadas con IL-1 β y

altas glucosa de manera simultánea. Por otro lado, la alta glucosa por sí misma no indujo un incremento de las IEVs NLRP3(+) con respecto de las observadas en la condición de control bajo condiciones de glucosa basal (Fig. 29, B).

6. La IL-1 β induce la presencia de componentes del inflammasoma NLRP3 en contenido de las sEVs de CMLVH, que se potencia en alta glucosa

Una vez analizada la presencia de los componentes del inflammasoma NLRP3 en las IEVs de las CMLVH, quisimos analizar su presencia en la población de sEVs.

Los resultados indicaron que las sEVs procedentes de CMLVH en condiciones basales o de alta glucosa en ausencia de IL-1 β no presentaban estas proteínas del inflammasoma NLRP3. Por otro lado, el análisis de las sEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en glucosa basal demostró la presencia de la proteína NLRP3, y la forma activa de la IL-1 β en estas sEVs. Respecto al estudio de las sEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β en alta glucosa, se observó una potenciación en la presencia de estas proteínas respecto a la observada en las sEVs de CMLVH tratadas únicamente con la citoquina (Fig. 29, A).

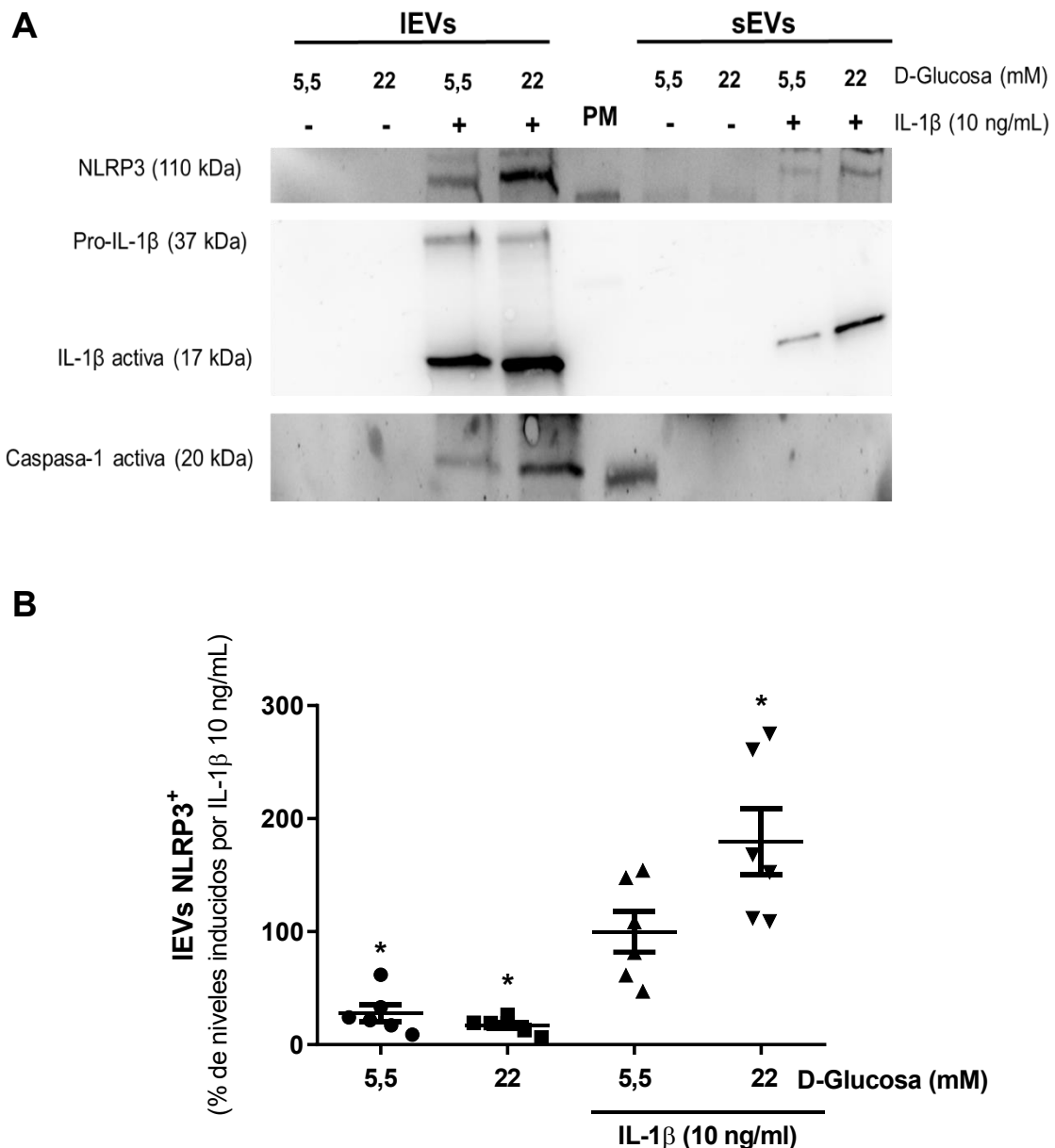


Figura 29. La IL-1 β induce la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 en el contenido de las IEVs y sEVs de CMLVH, que se potencia en alta glucosa. (A) Gel representativo de la distribución diferencial de los componentes del inflamasoma NLRP3 (NLRP3, pro-IL-1 β , IL-1 β y caspasa-1 activa) entre las IEVs y las sEVs producidas por las CMLVH expuestas al tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) en glucosa basal o en alta glucosa durante 18 h. (PM: Peso molecular) **(B)** Determinación de la presencia de NLRP3 en las IEVs procedentes de CMLVH en respuesta a los tratamientos indicados, mediante citometría de flujo (detección de IEVs NLRP3⁺). Los resultados se presentan como el porcentaje del número de IEVs NLRP3⁺ respecto del nivel producido por CMLVH en respuesta a IL-1 β (10 ng/mL) en glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de al menos seis experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL)

PARTE III

Una vez conocidos los efectos proinflamatorios y prosecretorios de la IL-1 β sobre las CMLVH, y su potenciación en presencia de altas concentraciones de D-glucosa, quisimos analizar si el bloqueo del receptor IL-1R1 con el fármaco anakinra, proteína recombinante análoga del antagonista natural del IL-1R1, sería capaz de prevenir estos efectos y el efecto sinérgico de la alta glucosa en CMLVH.

1. Anakinra previene la activación de NF- κ B ejercida por la IL-1 β , y su potenciación en alta glucosa

Las CMLVH se pretrataron con anakinra (Ak, 1 μ g/mL) durante 30 minutos previamente a la exposición a IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa durante 18 horas. Posteriormente, se detectaron mediante WB los niveles de la subunidad p65 fosforilada (p_p65), indicativa de la activación de NF- κ B. Los resultados obtenidos indicaron que anakinra no solo fue capaz de prevenir totalmente la activación de NF- κ B por parte de la IL-1 β , sino que además previno la potenciación de sus efectos bajo alta glucosa.

Por otra parte, el tratamiento con anakinra no indujo ninguna modificación significativa en los niveles de p_p65 fosforilada por sí sola o en presencia de altos niveles de D-glucosa, respecto de los niveles en la situación basal (Fig. 30).

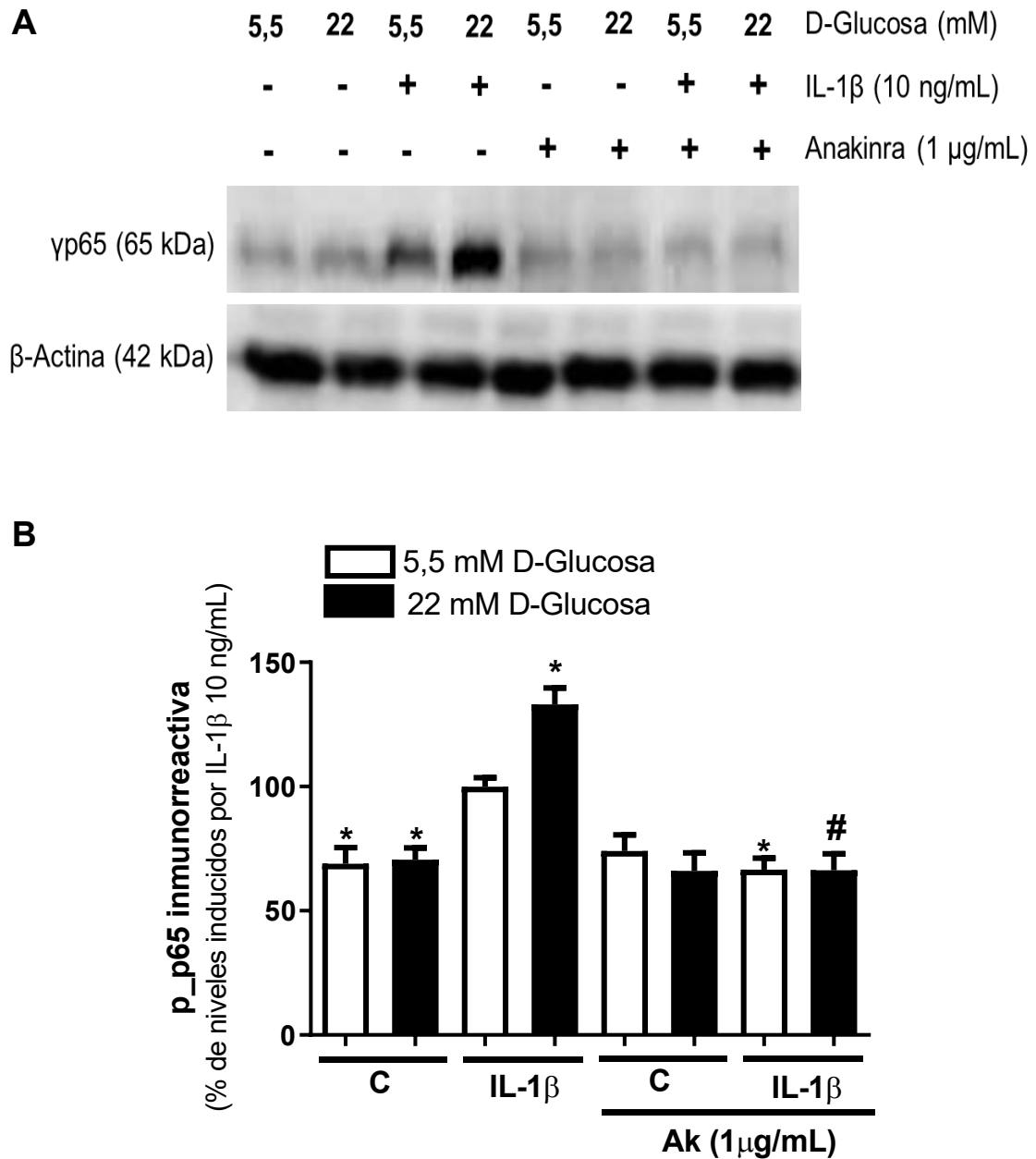


Figura 30. Anakinra previene la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β y su potenciación en alta glucosa en CMLVH. (A) Geles representativos de la activación de NF- κ B por IL-1 β , representada como expresión de p_p65. Las CMLVH se trataron con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa, en ausencia o presencia del fármaco anakinra (Ak; 1 μ g/mL). **(B)** Cuantificación de los niveles de p_p65 inmunorreactiva. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción por IL-1 β 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de ocho experimentos independientes. * p <0,05 frente a IL-1 β (10 ng/mL) # p <0,05 frente a IL-1 β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM)

2. Anakinra previene la activación del inflamasoma NLRP3 ejercida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa

Una vez demostrado que anakinra era capaz de prevenir la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β , quisimos analizar si el bloqueo con anakinra sería también capaz de impedir la primera fase en la activación del inflamasoma NLRP3, que en su forma canónica es dependiente de NF- κ B. En este sentido, tras el tratamiento de las CMLVH con IL-1 β (10 ng/mL) en presencia o no del fármaco anakinra (1 μ g/mL), en presencia de glucosa basal o alta glucosa, se cuantificaron mediante WB los niveles de las proteínas NLRP3 y la pro-IL-1 β .

Los resultados observados demostraron que el bloqueo farmacológico del receptor de IL-1 β impidió la inducción de estas dos proteínas de la fase de cebado del inflamasoma NLRP3 inducida por la propia IL-1 β exógena. Además, la acción de anakinra previno también el efecto sinérgico de la IL-1 β y las altas concentraciones de D-glucosa en la inducción de estas proteínas. Por otra parte, el tratamiento con anakinra por sí solo no modificó los niveles de NLRP3 ni de pro-IL-1 β en comparación con los niveles observados en el control (Fig. 31).

Comprobado el bloqueo de la fase de cebado del inflamasoma, quisimos estudiar si esto suponía, a su vez, un bloqueo en la fase final de activación del inflamasoma NLRP3, estudiada mediante la cuantificación de los niveles de caspasa-1 activa e IL-1 β activa. Para ello las CMLVH fueron expuestas a los tratamientos indicados anteriormente en presencia o ausencia de un pretratamiento durante 30 minutos con anakinra (1 μ g/mL) o con el fármaco MCC950 (1 μ M), inhibidor de la activación del inflamasoma, con el objetivo de comparar la eficacia de ambos fármacos.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de anakinra para prevenir el incremento de los niveles de la caspasa-1 activa y de la forma activa de la IL-1 β inducido por el tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL). Además, anakinra previno la potenciación observada en presencia de altas concentraciones de D-glucosa. Por otra parte, el tratamiento con anakinra, en condiciones de glucosa basal o en alta glucosa, no indujo cambios por sí misma en la activación del inflamasoma NLRP3 respecto a los niveles observados en la situación basal.

En cuanto a MCC950, se observó que este fármaco fue capaz de prevenir el aumento en la expresión de las formas de la caspasa-1 activa y de la IL-1 β activa inducida por la IL-1 β , consiguiendo reducir sus efectos de manera significativa incluso en la potenciación por alta D-glucosa. Al igual que anakinra, MCC950 por sí solo no indujo ningún cambio en los niveles de estas proteínas respecto de la situación basal (Fig. 32).

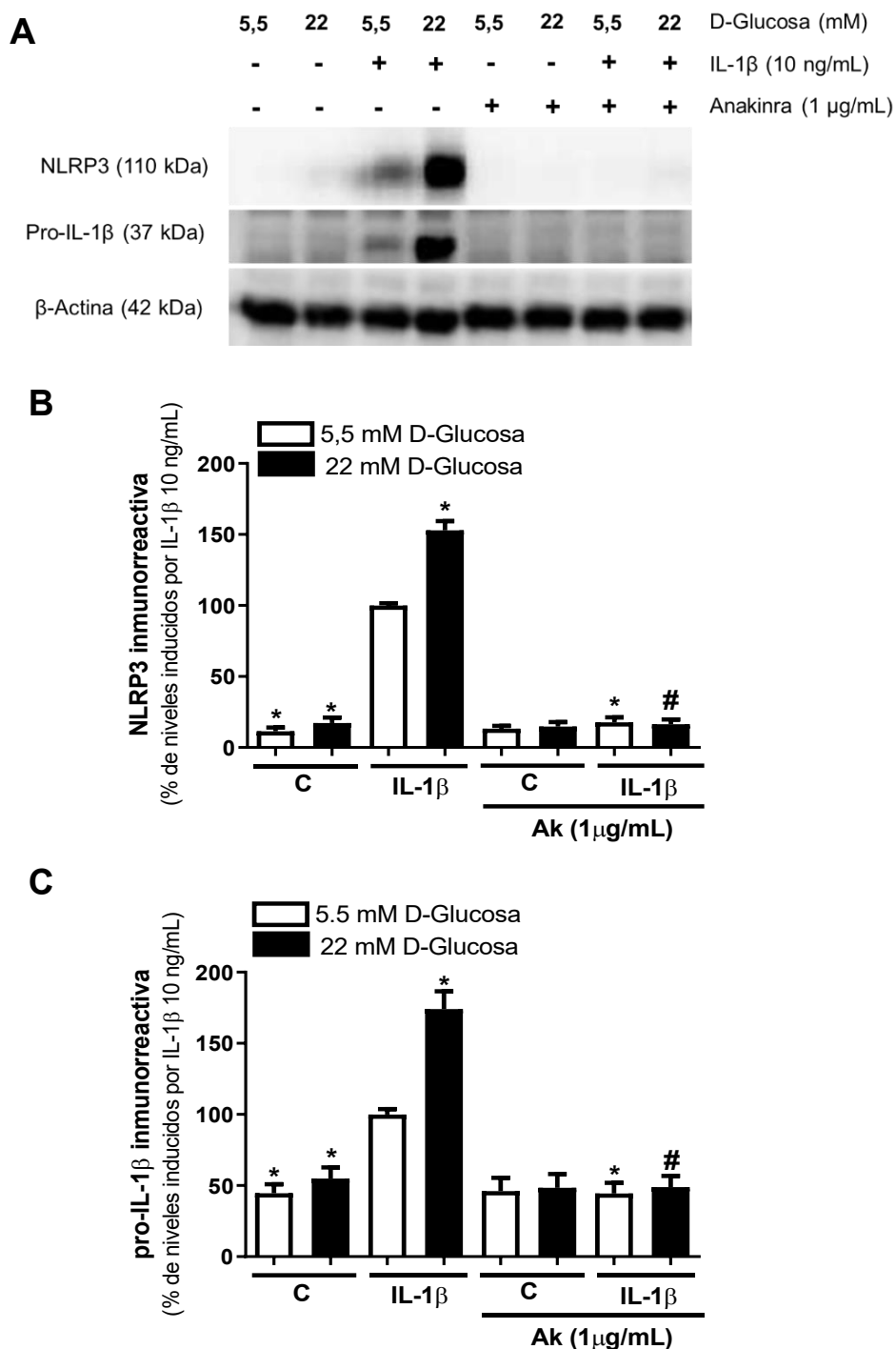


Figura 31. Anakinra previene la inducción de la fase de cebado del inflamasoma NLRP3 inducida por IL-1 β y su potenciación en alta glucosa en CMLVH. (A) Geles representativos de expresión de NLRP3 y pro-IL-1 β , detectadas por WB en CMLVH expuestas a IL-1 β (10 ng/mL) en presencia o no de anakinra (Ak; 1 μ g/mL) en condiciones de glucosa basal alta glucosa durante 18 horas. **(B, C)** Cuantificación de los niveles de proteínas inmunorreactivas en respuesta a los tratamientos anteriores. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción por IL-1 β 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de ocho experimentos independientes. * p <0,05 frente a IL-1 β (10 ng/mL) # p <0,05 frente a IL-1 β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM)

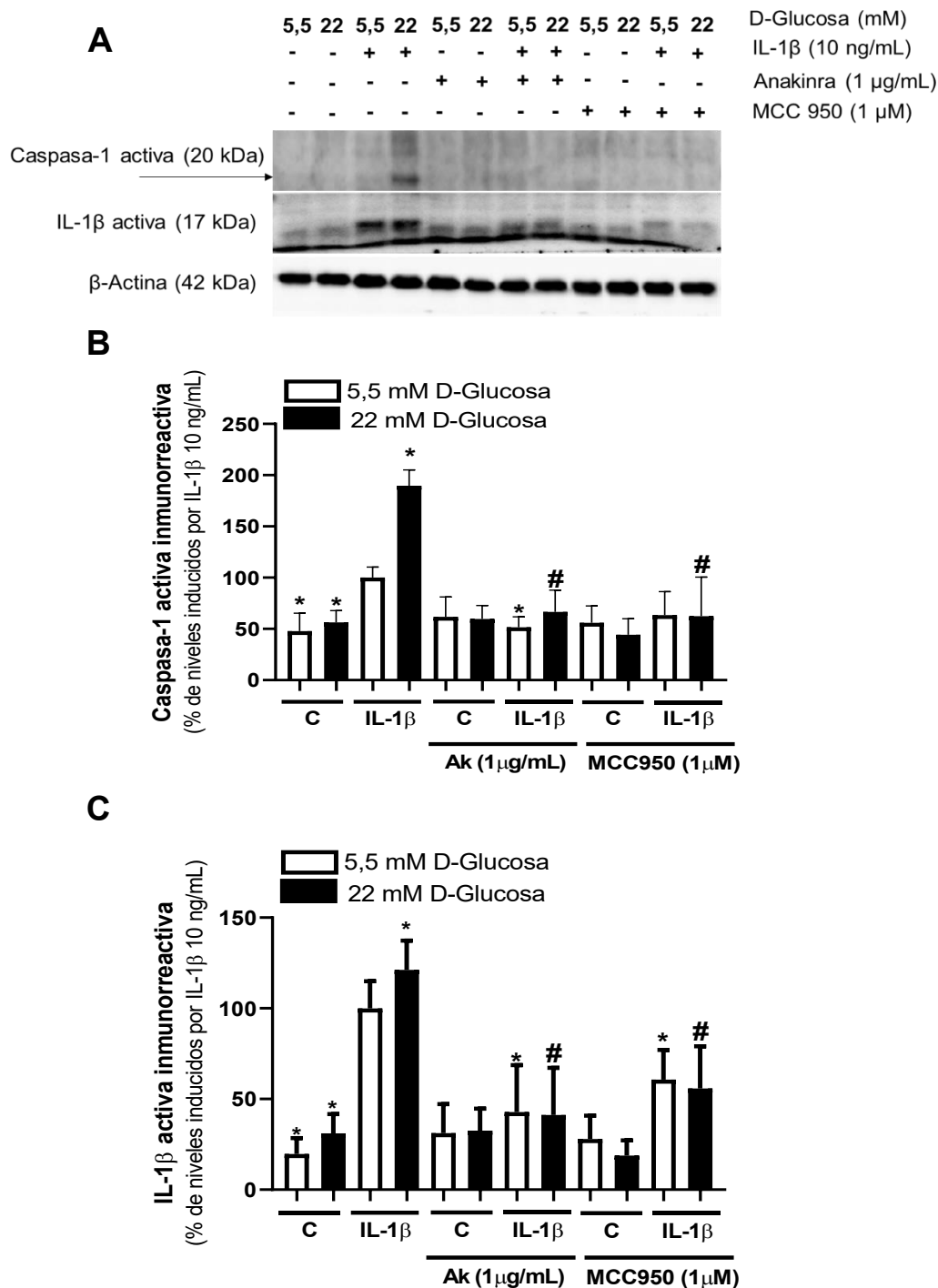


Figura 32. Anakinra previene la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por IL-1 β y su potenciación por alta D-glucosa en CMLVH. (A) Geles representativos de la expresión de caspasa-1 e IL-1 β activa detectada por WB en CMLVH expuestas a IL-1 β (10 ng/mL) en presencia o no de anakinra (Ak; 1 μ g/mL) o MCC950 (1 mM) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa durante 18 horas. **(B, C)** Cuantificación de los niveles de proteínas inmunorreactivas en respuesta a los tratamientos anteriores. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción por IL-1 β 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de ocho experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL) # $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM)

3. Anakinra previene la expresión de PKM2 en CMLVH inducida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa

Demostrada la capacidad inhibidora de anakinra sobre el cebado y activación del sistema del inflamasoma NLRP3 en las CMLVH, quisimos comprobar si también sería capaz de prevenir los efectos prosecretorios de la IL-1 β , y su potenciación con alta glucosa.

En este sentido, quisimos comprobar si el bloqueo del receptor de IL-1 con anakinra, o la inhibición del inflamasoma NLRP3 con MCC 950, era capaz de prevenir o reducir los efectos de la citoquina sobre el cambio metabólico experimentado por las CMLVH en respuesta al tratamiento con IL-1 β en condiciones de glucosa basal o con alta glucosa.

Los resultados demostraron la capacidad de anakinra (1 μ g/mL) para prevenir la expresión de PKM2 inducida por la IL-1 β en condiciones de glucosa basal, así como para prevenir su expresión exacerbada inducida por la citoquina en alta glucosa. MCC 950 (1 μ M) no fue capaz de prevenir el incremento en la expresión de PKM2 inducido por IL-1 β en presencia de glucosa basal. Sin embargo, redujo significativamente la potenciación en los niveles de expresión de la proteína bajo alta glucosa. Además, ninguno de los dos fármacos modificó la expresión de la PKM2 por sí mismo respecto a los controles (Fig. 33).

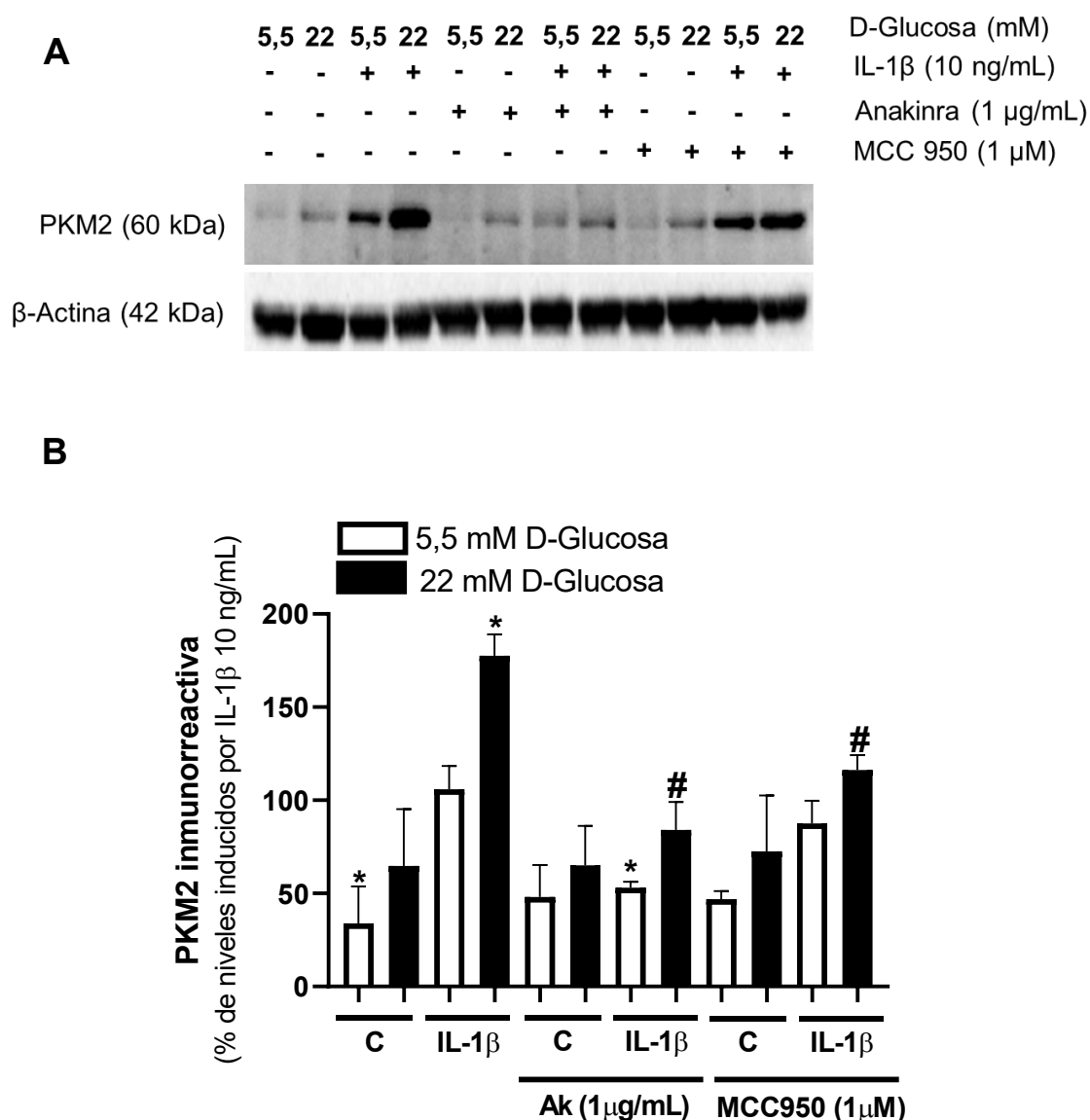


Figura 33. Anakinra y MCC950 previenen la expresión de PKM2 inducida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa en CMLVH. (A) Geles representativos de la inducción de PKM2 detectada por WB en CMLVH expuestas a IL-1 β (10 ng/mL) en presencia o no de anakinra (Ak; 1 μ g/mL) o MCC950 (1 mM) en condiciones de glucosa basal o de alta glucosa durante 18 horas. **(B)** Cuantificación de los niveles de PKM2 inmunorreactiva en respuesta a los tratamientos anteriores. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción por IL-1 β 10 ng/mL en condiciones de glucosa basal, expresados, como la media \pm EEM de ocho experimentos independientes. * p <0,05 frente a IL-1 β (10 ng/mL) # p <0,05 frente a IL-1 β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM)

4. Anakinra previene la producción de IEVs en CMLVH inducida por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa

Una vez confirmado que anakinra era capaz de prevenir los cambios en la expresión de PKM2 inducidos por la IL-1 β , así como su potenciación en altas concentraciones de D-glucosa, quisimos estudiar si anakinra sería capaz de prevenir la producción y liberación de vesículas extracelulares por las CMLVH *in vitro* en respuesta a la IL-1 β .

Los resultados indicaron que el tratamiento con anakinra (1 μ g/mL) previno el incremento en la producción de IEVs inducido por la IL-1 β (10 ng/mL), así como la potenciación de esta producción inducida por la citoquina en alta glucosa. Asimismo, el tratamiento con anakinra por sí solo o en alta glucosa no indujo ningún cambio en la liberación de IEVs en comparación con los niveles control (Fig. 34).

5. Anakinra previene la producción de sEVs en CMLVH inducida por la IL-1 β , y su potenciación en alta glucosa

Comprobada la capacidad de anakinra para impedir la liberación de IEVs, quisimos verificar si este efecto se repetía en el caso de las sEVs. El tratamiento de las CMLVH con anakinra (1 μ g/mL) durante los 30 minutos previos al tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o en alta glucosa durante 18 h previno la estimulación de la liberación de sEVs inducida por la citoquina, así como su potenciación en presencia de alta glucosa (Fig. 35).

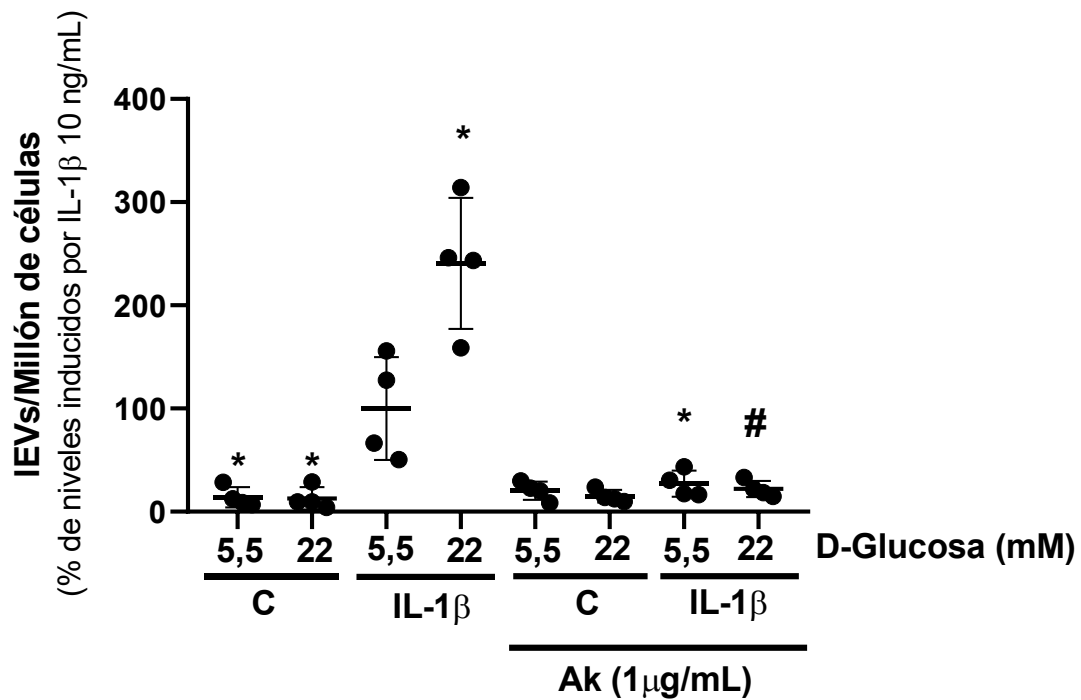


Figura 34. Anakinra previene el incremento en la liberación de IEVs inducido por la IL-1β y su potenciación en alta glucosa en CMLVH. Cuantificación por experimentos de citometría de flujo del número de IEVs producidas por las CMLVH en respuesta al tratamiento con IL-1β (10 ng/ml) en presencia o ausencia de anakinra (Ak; 1 μg/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa. Los resultados se presentan como porcentaje de IEVs por millón de células respecto a los niveles producidos en respuesta a IL-1β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal, expresados como la media ± EEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1β (10 ng/mL) # $p < 0,05$ frente a IL-1β 10 ng/mL + D-Glucosa (22mM)

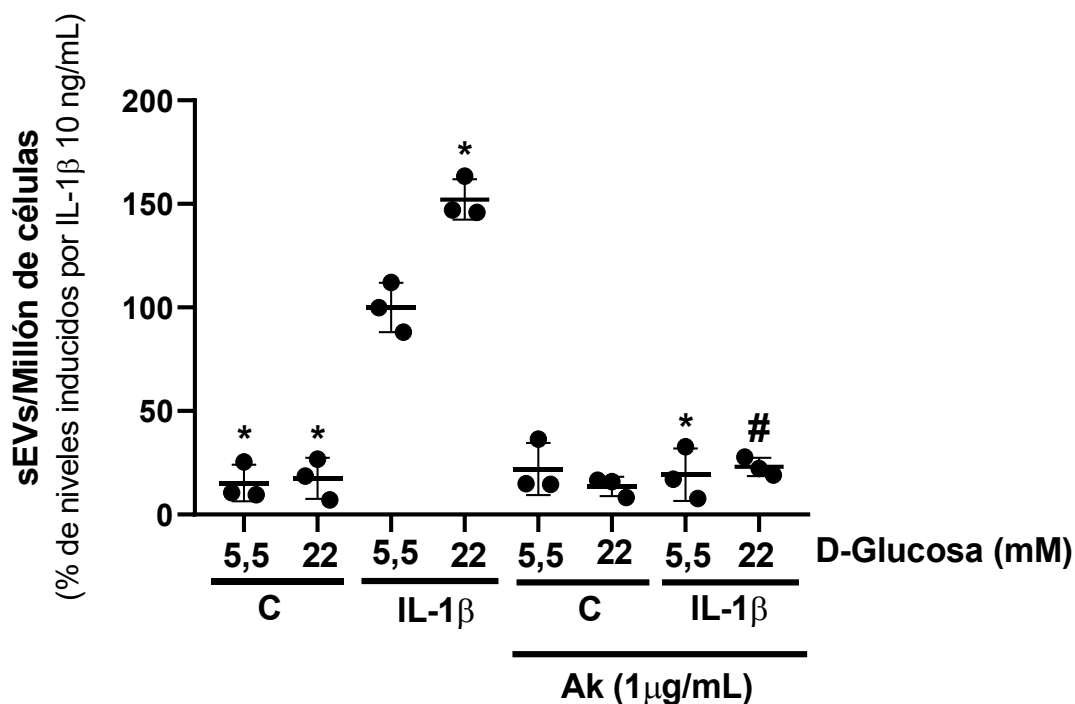


Figura 35. Anakinra previene el incremento en la liberación de sEVs inducido por la IL-1 β y su potenciación en alta glucosa en CMLVH. Cuantificación por experimentos de “nanotracking” del número de sEVs producidas por las CMLVH en respuesta al tratamiento con IL-1 β (10 ng/ml) en presencia o ausencia de anakinra (Ak; 1 μ g/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa. Los resultados se presentan como porcentaje de IEVs por millón de células respecto a los niveles producidos en respuesta a IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal, expresados como la media \pm EEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL) # $p < 0,05$ frente a IL-1 β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM)

6. Anakinra previene la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3 en el contenido de las EVs de CMLVH y su potenciación en alta glucosa

Tras observar la capacidad de anakinra para disminuir la liberación de EVs, quisimos estudiar si el tratamiento con anakinra sería capaz de impedir la presencia de los componentes del inflamasoma NLRP3, y la propia IL-1 β en las EVs liberadas por las CMLVH.

Para ello, las CMLVH se incubaron con anakinra (1 μ g/mL) los 30 minutos previos al tratamiento con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa durante 18 h. La presencia de la proteína NLRP3 en las IEVs se analizó mediante técnicas de citometría de flujo, debido a los bajos niveles de producción de IEVs en las condiciones basales, alta glucosa y en todas las condiciones de tratamiento con el fármaco anakinra. El contenido proteico de las sEVs se analizó mediante WB, cuantificando los niveles de expresión de la proteína NLRP3, y la forma activa de la IL-1 β . Además, se analizó la presencia de marcadores proteicos de sEVS, como la proteína ALIX.

Los resultados demostraron que anakinra fue capaz de prevenir el incremento del número de IEVs NLRP3⁺ inducido por la IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal, así como la potenciación de este incremento con el tratamiento de la citoquina en alta glucosa. Por otra parte, el tratamiento de anakinra no modificó los niveles de IEVs NLRP3⁺ por sí mismo, o en alta glucosa, respecto de los niveles observados en la situación basal (Fig. 36, A).

En cuanto a las sEVs, el tratamiento de anakinra previno totalmente la presencia de la proteína NLRP3 y la forma activa de IL-1 β , tanto en sEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β en condiciones de glucosa basal, como con alta glucosa. Por último, para comprobar que estas sEVs seguían presentando marcadores proteicos específicos de sEVs se analizó la presencia de la proteína ALIX en todas las sEVs procedentes de las CMLVH incubadas con las condiciones de tratamiento descritas, confirmándose su presencia en todas ellas (Fig. 36, B).

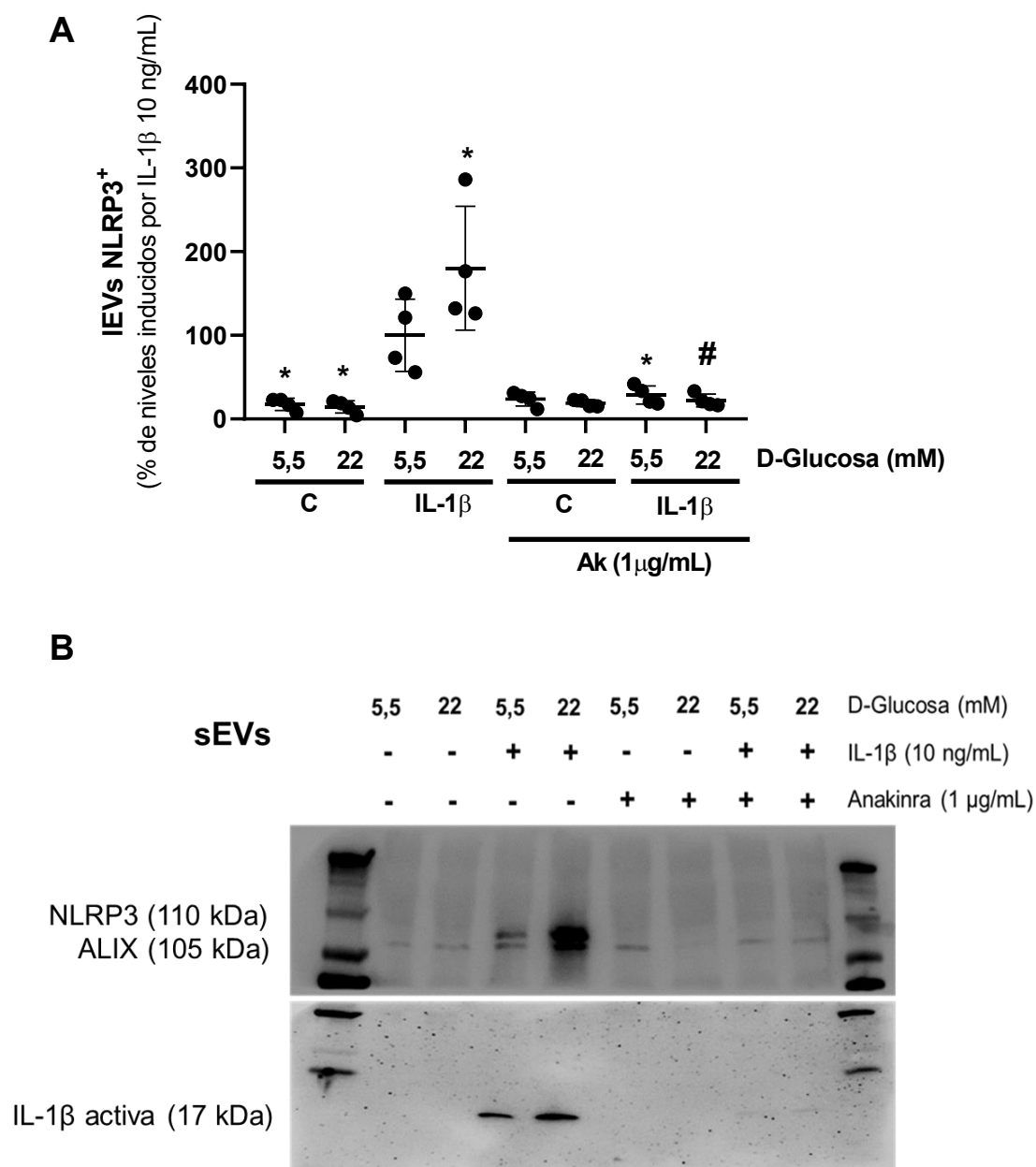


Figura 36. Anakinra previene la presencia de componentes del inflammasoma NLRP3 en el contenido de las EVs de CMLVH y su potenciación en alta glucosa. **(A)** Determinación de la presencia de NLRP3 en las IEVs procedentes de CMLVH en respuesta al tratamiento con IL-1β (10 ng/ml) en presencia o ausencia de anakinra (Ak; 1 μg/mL) en condiciones de glucosa basal o alta glucosa, mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan como el porcentaje del número de IEVs NLRP3⁺ respecto del nivel producido por CMLVH en respuesta a IL-1β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal, expresados como la media ± EEM de cuatro experimentos independientes. **p*<0,05 frente a IL-1β (10 ng/mL) #*p*<0,05 frente a IL-1β (10 ng/mL) + D-Glucosa (22 mM). **(B)** Gel representativo de la distribución diferencial de los componentes del inflammasoma NLRP3 (NLRP3, e IL-1β activa), y de la presencia de ALIX, en las sEVs producidas por las CMLVH en respuesta a los tratamientos indicados.

PARTE IV

Existen diversos estudios en los que se realizan bioensayos para estudiar la respuesta que generan las EVs sobre otros cultivos celulares, ya sean procedentes de pacientes o de estudios *in vitro*. Por ello se quiso comprobar si las EVs producidas por el músculo liso vascular podrían ejercer algún efecto autocrino o paracrino sobre las propias células de músculo liso vascular.

1. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1 β y/o alta glucosa inducen la expresión de iNOS y NLRP3 en CMLVH

Caracterizadas y analizadas las IEVs producidas por las CMLVH *in vitro*, y habiéndose confirmado la presencia de componentes del inflamasoma NLRP3, como la propia IL-1 β en las mismas, quisimos comprobar si estas IEVs podrían ejercer algún efecto inflamatorio sobre el propio cultivo primario de células CMLVH.

Para ello, las CMLVH testigo se expusieron a concentraciones crecientes (2,5 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de IEVs procedentes de CMLVH que habían sido tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o en alta glucosa durante 24 h. Las CMLVH también se expusieron a IEVs procedentes de CMLVH en condiciones basales de D-glucosa (5,5 mM) a una concentración máxima de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h. Posteriormente se cuantificaron los niveles de expresión de las proteínas inflamatorias NLRP3 e iNOS, ya que esta última es uno de los marcadores de inflamación por excelencia que se expresan en el músculo liso vascular.

Los resultados indicaron que el tratamiento con IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en concentraciones de glucosa basal tendía a incrementar la expresión de NLRP3 e iNOS de manera concentración dependiente (Fig. 37). Esta tendencia se acentuó cuando el tratamiento se realizó con IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en alta

glucosa. Sin embargo, esta tendencia no fue significativamente estadística (Fig. 37)

Por otra parte, el tratamiento con las IEVs procedentes de células CMLVH en condiciones de glucosa basal a la máxima concentración (20 µg/mL) no indujo ningún incremento en la expresión de NLRP3 e iNOS. Las células también se trataron con el vehículo en el que están diluidas las IEVs, el NaCl al 0,9%, sin observar ningún cambio respecto de los niveles de expresión observados en las células control (Fig. 37).

2. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1β y/o alta glucosa inducen la formación del speck de ASC en CMLVH

A continuación, quisimos analizar si el tratamiento con estas IEVs sería capaz de inducir también la formación del *speck* de ASC como marcador de la activación del inflammasoma NLRP3.

Para ello, las CMLVH se expusieron a concentraciones crecientes (10 a 20 µg/mL) de IEVs procedentes de CMLVH que habían sido tratadas con IL-1β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal o en alta glucosa durante 24 h. Las CMLVH también se expusieron a IEVs procedentes de CMLVH en condiciones de glucosa basal a una concentración máxima de 20 µg/mL durante 24 h. Posteriormente, mediante inmunofluorescencia indirecta se comprobó si este tratamiento inducía la formación del complejo de ASC o *speck* (Fig. 38).

Los resultados indicaron que el tratamiento con IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1β (10 ng/mL) en condiciones de glucosa basal incrementó de manera significativa la formación del *speck* de ASC de manera concentración dependiente (Fig. 39). Este incremento se potenció de manera significativa cuando el tratamiento se realizó con IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1β (10 ng/mL) en alta glucosa (Fig. 39). Por otra parte, el tratamiento con IEVs procedentes de células CMLVH en condiciones basales a la máxima concentración 20 µg/mL no indujo ningún incremento significativo en la formación del *speck* respecto a los niveles basales.

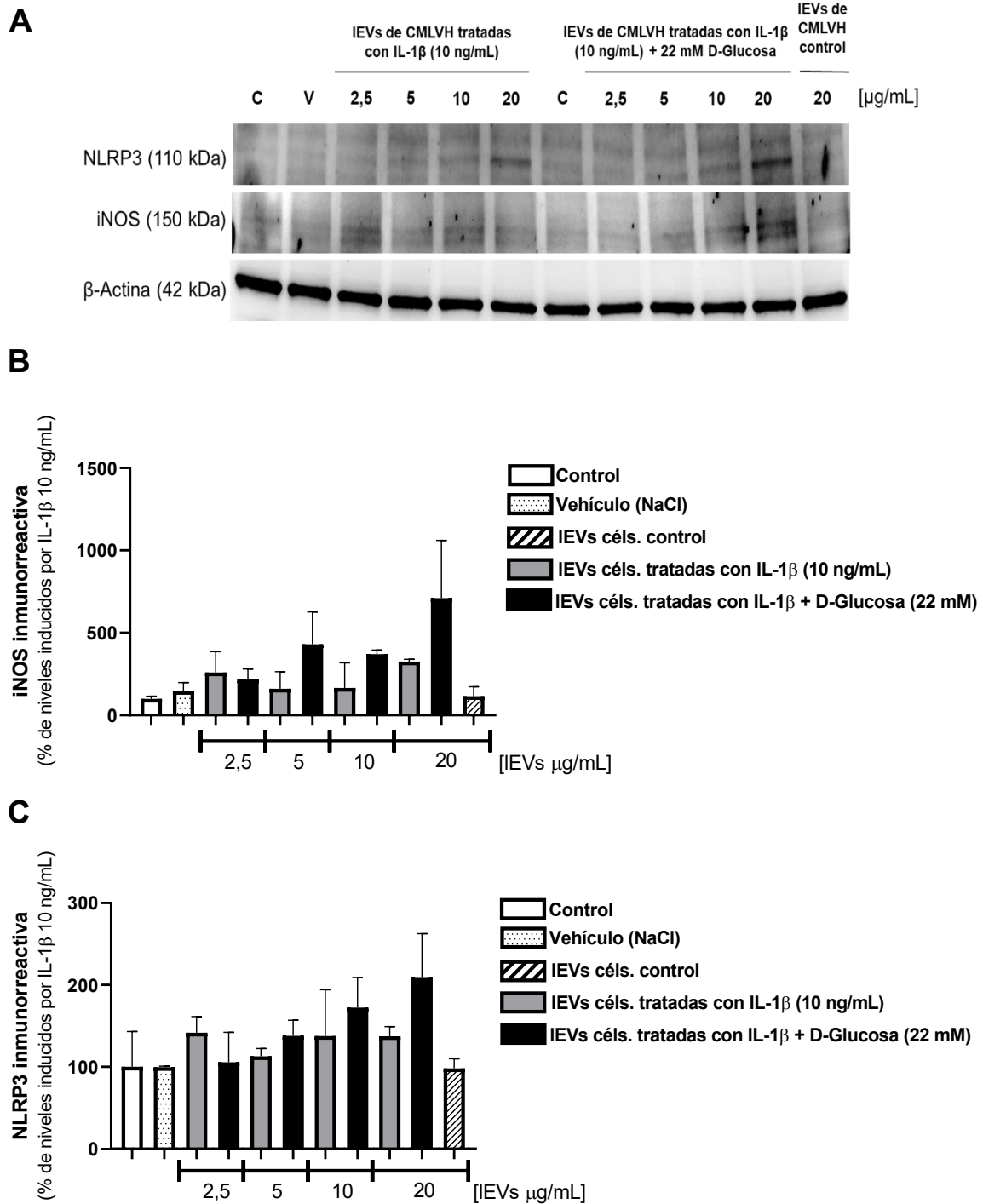


Figura 37. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1 β y/o alta glucosa inducen la expresión de iNOS y NLRP3 en CMLVH Las CMLVH se expusieron a concentraciones crecientes (2,5-20 μ g/mL) de IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en glucosa basal o en alta glucosa durante 24 h. **(A)** Geles representativos de la inducción de la expresión de iNOS y NLRP3 en CMLVH en respuesta a los tratamientos indicados (V: vehículo). **(B, C)** Cuantificación de los niveles de las proteínas inmunorreactivas en respuesta a los tratamientos anteriores. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a la inducción en condiciones control, expresados como la media \pm EEM de dos experimentos independientes.

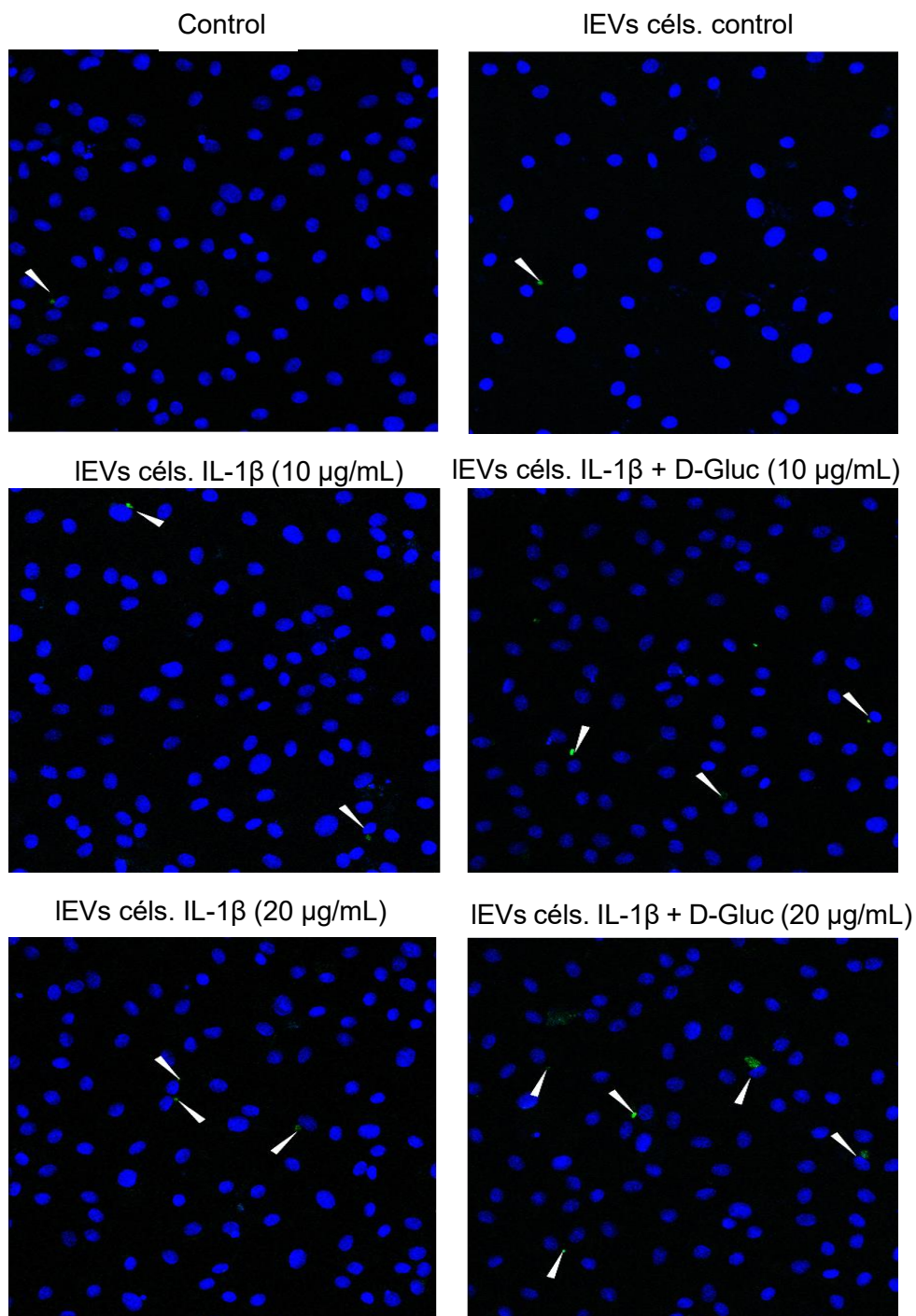


Figura 38. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1 β y/o alta glucosa inducen la formación del speck de ASC en CMLVH. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de los complejos de proteína ASC (en verde) tomadas por microscopía confocal de CMLVH expuestas a concentraciones crecientes (10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β (10 ng/mL) en condiciones basales (5,5 mM) o en altas concentraciones de D-glucosa (22 mM) durante 24 h en las diferentes condiciones de tratamiento. Los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI (en azul).

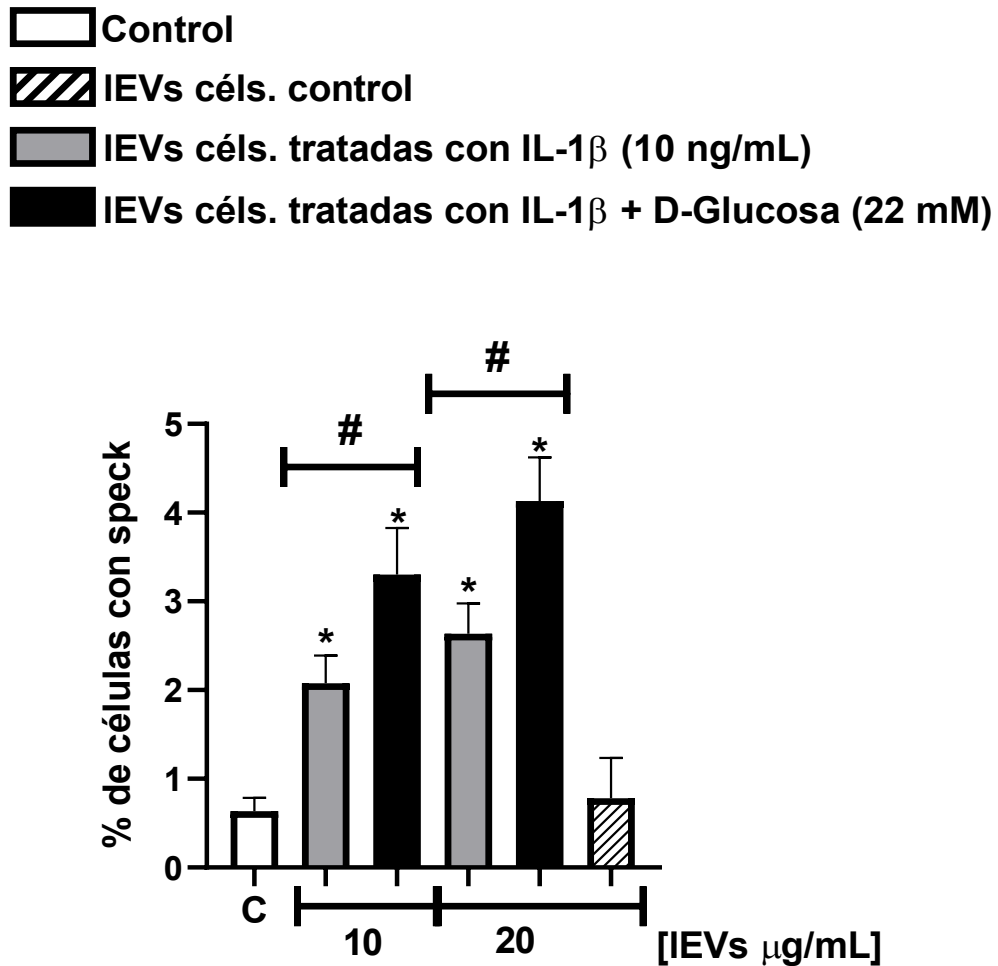


Figura 39. Las EVs aisladas de CMLVH estimuladas con IL-1β y/o alta glucosa inducen la formación del speck de ASC en CMLVH Las CMLVH se expusieron a concentraciones crecientes (10-20 µg/mL) de IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1β (10 ng/mL) en glucosa basal o en alta glucosa durante 24 h. Cuantificación del porcentaje de CMLVH que presentan *specks* en respuesta a los tratamientos indicados. Los resultados se presentan como el porcentaje de células con *speck* para cada tratamiento, expresados como la media ± EEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente a control # $p < 0,05$ frente a IEVs céls. tratadas con IL-1β (10 o 20 ng/mL).

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

La figura que se incluye a continuación resume los principales resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, indicando los diferentes mecanismos celulares que se han descrito, y están implicados en la inflamación de las CMLVH inducida por la IL-1 β , y su modulación en condiciones de alta glucosa

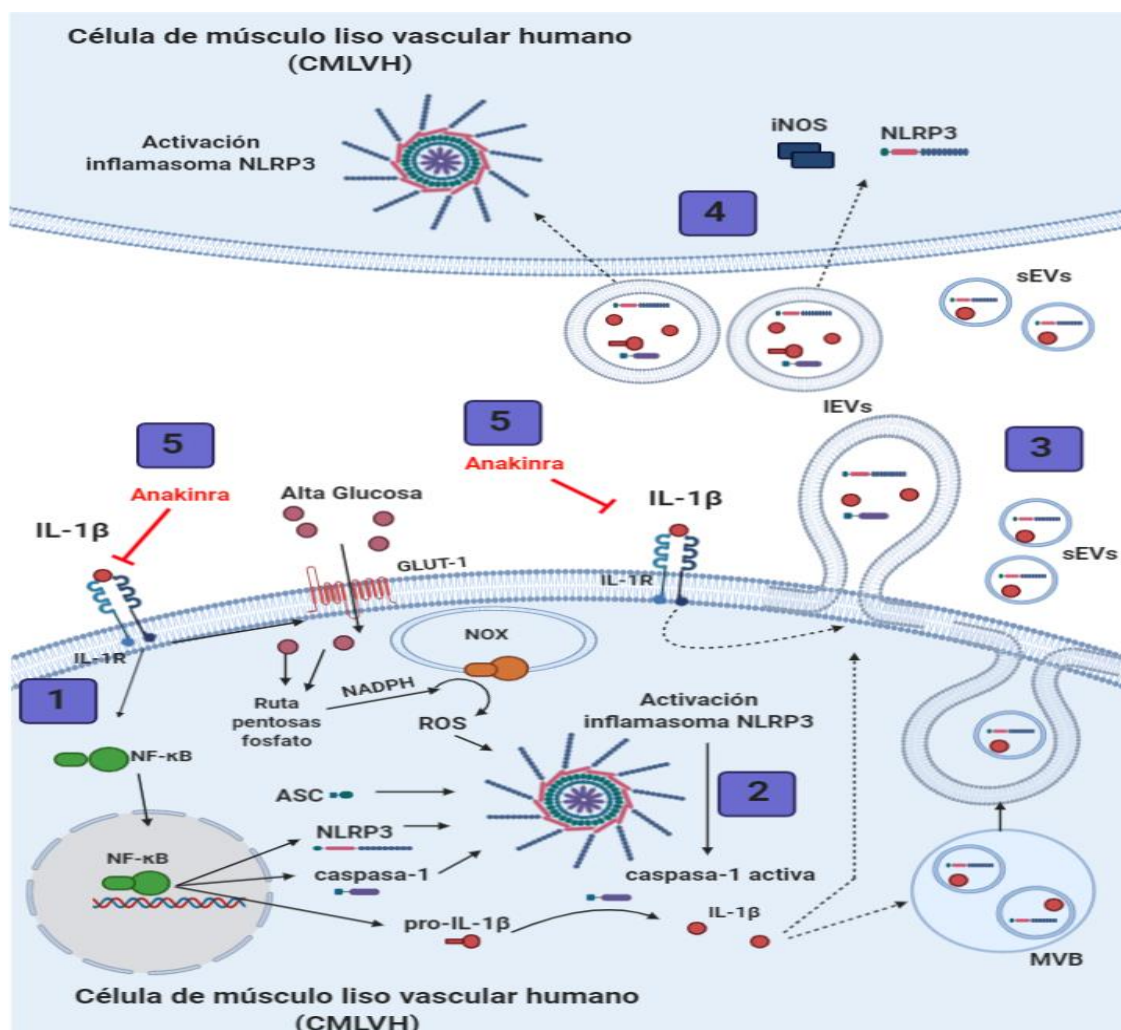


Figura 40. La glucosa potencia los efectos inflamatorios y secretores inducidos por la IL-1 β en CMLVH. La IL-1 β induce ambas fases de la activación del inflammasoma NLRP3. **(1)** La fase de cebado, con la activación de NF- κ B, y el incremento en la expresión de NLRP3, caspasa-1 y pro-IL-1 β . **(2)** En la fase de activación, inducida por las ROS procedentes de la NOX y la propia IL-1 β , se forma la estructura *speck*, con la consiguiente activación de la caspasa-1 y de la propia IL-1 β . **(3)** La glucosa potencia los efectos secretores inducidos por la IL-1 β en las CMLVH, induciéndose la liberación de sEVs e IEVs, capaces de transportar componentes del inflammasoma NLRP3 y la propia IL-1 β en su interior. **(4)** Estas IEVs fueron capaces de inducir una respuesta inflamatoria en CMLVH induciendo la formación de la estructura *speck*. **(5)** Por último, el fármaco anakinra, es capaz de prevenir no solo los efectos proinflamatorios y prosecretores inducidos por la IL-1 β en CMLVH, sino también su potenciación en alta glucosa.

DISCUSIÓN

La mayor causa de morbilidad en pacientes diabéticos y obesos son las CVD, siendo además la vasculopatía diabética y sus consecuencias la principal causa de mortalidad en estos pacientes. Entre las diferentes manifestaciones de esta vasculopatía destaca la aparición y el desarrollo acelerado del proceso de aterosclerosis, que afecta principalmente a los vasos de gran tamaño y de calibre medio, desembocando en la aparición de ictus, IAM e isquemia. En el contexto de la DM, numerosos estudios han centrado sus esfuerzos en el control estricto de la hiperglucemia para prevenir o reducir la aparición de estas complicaciones vasculares. De hecho, en los últimos años, diferentes estudios se han dedicado a los diferentes mecanismos fisiopatológicos que desencadena la hiperglucemia, que ha sido identificada como un factor de riesgo vascular independiente. Estos mecanismos quedaron englobados en la teoría unificadora de Brownlee en el año 2001 (Brownlee, 2001). En ella, Brownlee asume que el incremento de la glucosa extracelular conlleva un mayor transporte al interior celular incrementándose así la concentración de glucosa intracelular. Este exceso de glucosa en el interior celular induce la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial y la acumulación de ROS. Este exceso de ROS va a favorecer la formación y acumulación de AGEs, siendo ambos factores los que se postulan como el mecanismo unificador a través del cual la hiperglucemia genera daño en las células vasculares (Brownlee, 2001; Henning, 2018). A pesar de la propuesta de Brownlee, destacan algunos ensayos clínicos, como los estudios UKPDS y DCCT, en los que se observó que el control estricto de los niveles de glucosa consiguió retrasar la aparición de las complicaciones vasculares, pero, sin embargo, no consiguió reducir de manera significativa la tasa de mortalidad cardiovascular y la aparición de complicaciones macrovasculares tras 10 años de tratamiento (UKPDS, 1998; Nathan, 2014). Por ello, el abordaje terapéutico de la DM no debe centrarse exclusivamente en la reducción de la hiperglucemia, ya que parece insuficientemente eficaz. Nuevos estudios sugieren la existencia de algún otro mecanismo fisiopatológico clave en el desarrollo y aparición de las complicaciones vasculares, como puede ser la inflamación.

Así, en los últimos años diversas evidencias han señalado la presencia en la DM2 de elevados niveles séricos de proteínas inflamatorias de fase aguda, como la hsPCR, que representa modificaciones más modestas de esta proteína

que se mantienen en el tiempo y que están asociadas positivamente a la aparición de eventos cardiovasculares (Helal *et al.*, 2012). Además, la hsPCR parece ser en realidad un marcador indirecto de la actividad tisular de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-1 β . De hecho, la presencia de elevados niveles de estos tres marcadores de manera sistémica señala que uno de los factores más característicos en la DM2 es la inflamación crónica de bajo grado, la cual posee un papel crítico en el desarrollo de la DM2, así como en las complicaciones vasculares asociadas a ella (Donath y Shoelson, 2011; Prattichizzo, 2017).

En este sentido, se han señalado diferentes mecanismos, a través de los cuales, la inflamación genera daño vascular, como la resistencia a la insulina, la disfunción del endotelio y del músculo liso vascular, así como la aterosclerosis, y el envejecimiento vascular prematuro. Se han propuesto numerosas vías de señalización celular y agentes inflamatorios implicados en la progresión de la enfermedad vascular en DM2. Este estudio se centra fundamentalmente en dos de ellos estrechamente relacionados con la inmunidad innata, la citoquina proinflamatoria IL-1 β y la vía inflamatoria del inflamasoma NLRP3.

La IL-1 β actúa amplificando la respuesta inflamatoria de la inmunidad innata incrementando la producción de mediadores inflamatorios y la respuesta de fase aguda, lo que es esencial para la resolución de infecciones y otro tipo de agresiones a los tejidos. Sin embargo, su sobreproducción puede resultar perjudicial en enfermedades inflamatorias y desórdenes metabólicos como la vasculopatía diabética (Gabay *et al.*, 2010; Grebe *et al.*, 2018). En este sentido, en la primera parte de esta tesis se demostró la capacidad de la IL-1 β de inducir la inflamación en cultivos de CMLVH, incrementando la activación de NF- κ B y la expresión de la proteína inflamatoria iNOS de manera concentración dependiente, con el objetivo de comprobar que estas células seguían respondiendo de la misma manera a la descrita en anteriores publicaciones de nuestro grupo de investigación, en los que se había descrito la capacidad de la IL-1 β para inducir la activación de vías proinflamatorias como el eje ERK1/2, NF- κ B e iNOS (Peiró *et al.*, 2016).

Con la finalidad de conocer más sobre los mecanismos inflamatorios mediados por la IL-1 β en la inflamación de los cultivos de CMLVH, se planteó

analizar el papel del inflamasoma NLRP3, el cual es uno de los principales mecanismos de la respuesta inmune innata y el productor principal de la IL-1 β . En este trabajo se ha demostrado que la IL-1 β en cultivos de CMLVH es de hecho capaz de promover la inducción de ambas fases implicadas en la activación del inflamasoma NLRP3. La IL-1 β activó la fase de cebado, que conlleva la activación de NF- κ B y el incremento de la síntesis de los diferentes componentes del complejo, la proteína NLRP3, y la pro-IL-1 β (Shao *et al.*, 2015). Asimismo, se demostró que la IL-1 β fue capaz de activar la segunda fase de la activación, en induciendo la formación del complejo *speck* y en último término la activación de la caspasa-1 y la producción de IL-1 β activa. (Hoss *et al.*, 2016; Baldrighi *et al.*, 2017). De esta manera, la acción de la IL-1 β redundante en su propia producción en las células del músculo liso vascular amplificando la señal inflamatoria inicial. Estos resultados apoyan diversas evidencias que señalan la implicación del inflamasoma NLRP3 en el mantenimiento de la inflamación crónica de bajo grado y en el desarrollo de la vasculopatía diabética (Sharma *et al.*, 2018). La sobreactivación del inflamasoma en la diabetes y en las lesiones vasculares, se produce en respuesta a una sobreproducción de DAMPS, como adipoquinas, estrés oxidativo, cristales de colesterol, entre otros, que inducen en último término una mayor producción y liberación de IL-1 β (Grebe *et al.*, 2018). De hecho, la inhibición genética o farmacológica del inflamasoma o de alguno de sus componentes atenuó o previno la aparición y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas de modelos animales, lo cual indica el importante papel del inflamasoma NLRP3 en el desarrollo de la aterosclerosis (Baldrighi *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018).

El presente trabajo demuestra que el incremento de la concentración de la glucosa extracelular en cultivos de CMLVH no es capaz de inducir la activación del inflamasoma NLRP3 por sí misma. Sin embargo, pone de manifiesto que, el incremento de las concentraciones de glucosa extracelular sí exacerba ambas fases de la activación del inflamasoma NLRP3 en cultivos de CMLVH, de tal manera que la producción final de IL-1 β que es significativamente superior a la inducida por la citoquina *per se* en concentraciones normales de glucosa extracelular. Estos resultados contradicen algunos estudios en los que defienden que la elevación de la concentración de glucosa en el medio extracelular *per se*

es capaz de generar la activación del complejo NLRP3 en el músculo liso vascular, el endotelio y otros tipos celulares (Chen *et al.*, 2020). Por el contrario, y acorde a los presentes resultados, otros estudios en macrófagos han observado que la potenciación de la activación del inflamasoma NLRP3 observada bajo elevadas concentraciones de glucosa (25mM) necesitaba de un estímulo inflamatorio previo (normalmente LPS + ATP) para inducir este efecto sinérgico (Sharma *et al.*, 2020).

De hecho, estos resultados coinciden plenamente con anteriores trabajos de nuestro equipo de investigación, en los que también se observó que la inflamación producida por la citoquina se exacerbaba en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, aunque la glucosa carecía de actividad inflamatoria *per se* (Lafuente *et al.*, 2008; Azcutia *et al.*, 2010; Peiró *et al.*, 2016). El mecanismo de esta sinergia inflamatoria entre la IL-1 β y la glucosa reside en el precondicionamiento de la citoquina sobre la célula muscular. En contra de lo que defiende Brownlee, nuestro grupo observó que el mero incremento de la concentración extracelular de glucosa no produce una mayor concentración de glucosa intracelular. Sin embargo, el tratamiento con la IL-1 β , previamente al incremento de la concentración extracelular de glucosa, induce la expresión del transportador GLUT-1, permitiendo así una mayor entrada de glucosa en la célula (Peiró *et al.*, 2016). Este exceso de glucosa en la célula es derivado parcialmente a la ruta metabólica de las pentosas fosfato, en la cual se genera una gran cantidad de NADPH, que es el sustrato de la enzima prooxidante NOX, induciéndose un exceso de ROS. Esta acumulación de estrés oxidativo va a inducir la activación exacerbada de NF- κ B y la sobreexpresión de iNOS debido a la acción de la IL-1 β en presencia de altas concentraciones de glucosa, tal y como ocurre en la DM (Peiró *et al.*, 2016). Esta activación exacerbada de NF- κ B, por la acumulación de ROS procedente de la NOX, se postula como el mecanismo, a través del cual, observamos que el incremento de las concentraciones extracelulares de glucosa potencia la fase de cebado del inflamasoma NLRP3 inducida por la IL-1 β , provocando una sobreexpresión de las proteínas NLRP3, pro-IL-1 β y ASC. Este mecanismo, junto a la acumulación de ROS, podría así contribuir también a la exacerbación observada en la fase de

activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la IL-1 β en elevadas concentraciones de glucosa extracelulares.

En este contexto, la NOX se ha descrito como una de las principales fuentes de ROS en las células vasculares (Jo *et al.*, 2016; Hoseini *et al.*, 2018), destacando particularmente la expresión de la isoforma NOX-1 en el músculo liso vascular en relación a procesos patológicos como la aterosclerosis o la hipertensión (Drummond *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2013; Newsholme *et al.*, 2016). Ya que además las ROS pueden inducir la fase de activación del inflamasoma NLRP3, exploramos si la NOX podría estar implicada en la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la IL-1 β y en su potenciación en altas concentraciones de glucosa extracelular. Se observó que la inhibición de la actividad NOX general con apocinina, y de la isoforma NOX-1 con el fármaco ML171 en particular (Altenhöfer *et al.*, 2015), fue capaz de reducir la producción de la IL-1 β activa inducida por la propia citoquina, así como su potenciación de la síntesis de IL-1 β activa en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Estos hallazgos señalan por tanto la implicación de las enzimas NOX, y en especial la NOX-1 en la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por la propia IL-1 β , y en la potenciación de la misma en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Esto apoya los estudios que defienden la actividad NOX como un mecanismo activador del inflamasoma y productor de inflamación crónica (Dostert *et al.*, 2008; Hewinson *et al.*, 2008), y la consideración de la NOX-1, como una potencial diana farmacológica en la patología aterosclerótica, tal y como se ha demostrado en modelos animales con la inhibición genética de esta isoforma (Sheehan *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2017).

Uno de los aspectos más importantes en la inflamación del músculo liso vascular son los cambios en el perfil metabólico de estas células. En este sentido, como se ha indicado anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que la IL-1 β en presencia de altas concentraciones de glucosa incrementa la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en CMLVH, pero también se observó un incremento de la producción de lactato indicando un mayor perfil glucolítico (Peiró *et al.*, 2016). Diversos estudios indican la presencia de un mayor perfil glucolítico en el músculo liso vascular de las lesiones ateroscleróticas, con una mayor expresión de enzimas relacionadas con el

metabolismo de la glucosa como la isoenzima piruvato quinasa M2 (PKM2) (Zhao *et al.*, 2020). Ésta cataliza el paso final de la glucólisis, la transfosforilación entre el fosfoenolpiruvato y difosfato de adenosina, produciendo ATP y piruvato (Dong *et al.*, 2016). Además de su función metabólica, la PKM2 actúa como activador de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT). Por otra parte, PKM2 se comporta como un factor de transcripción translocándose al núcleo e interactuando directamente con HIF1 α induciendo una mayor expresión de factores implicados en los procesos de hipoxia (Dong *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). De hecho, algunos estudios defienden el papel de la PKM2 y HIF1 α en la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos (Folco *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2016). Es por ello que en este estudio se comprobó si la IL-1 β podría inducir PKM2 y HIF-1 α en los cultivos de CMLVH. De acuerdo con la hipótesis planteada, se observó que la IL-1 β inducía la expresión de ambas proteínas, que se potenciaba además en presencia de elevadas concentraciones de glucosa extracelular. Estos datos se correlacionan con estudios que indicaban un incremento en la expresión de PKM2 y HIF1 α en CMLVH a través de la activación de NF- κ B (Alexander *et al.*, 2012), y una mayor intervención de estas vías metabólicas, además de la ruta de las pentosas fosfato, en el contexto de las complicaciones vasculares como la aterosclerosis y la calcificación de la capa media (Yamashita *et al.*, 2014; Mokas *et al.*, 2016; Balogh *et al.*, 2019).

Algunos estudios han indicado que un cambio en el perfil metabólico, como el que hemos demostrado en nuestros cultivos de CMLVH, con una mayor expresión de PKM2 y de factores implicados en procesos de hipoxia como HIF1 α , se relaciona con una mayor liberación de EVs en diferentes tipos celulares como células endoteliales, hepatocitos y células tumorales (Wei *et al.*, 2017; Burnley-Hall *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2020). Es por ello que en este trabajo se estudió si la IL-1 β podría inducir cambios en el perfil secretor de las EVs liberadas por los cultivos de CMLVH.

De hecho, uno de los hallazgos principales y muy novedosos de este trabajo es la capacidad de la IL-1 β para incrementar significativamente las EVs producidas por los cultivos de CMLVH. Además, este incremento se observó en ambos tipos de EVs, las IEVs y las sEVs. Respecto a las IEVs, estos resultados

relacionan diversos estudios que defienden que la activación de la NOX, o la vía ERK1/2 incrementa la formación de IEVs, con estudios previos de nuestro laboratorio que demuestran que la IL-1 β *per se* induce la activación de ambas vías de señalización (Kunzelmann-Marche *et al.*, 2001; Lafuente *et al.*, 2008; Burger *et al.*, 2011; Peiró *et al.*, 2016). Además, estos resultados concuerdan con otro estudio en los que otro agente inflamatorio como el TNF α incrementó la producción de IEVs en células endoteliales a través de la activación de NF- κ B (Simoncini *et al.*, 2009). En cuanto a las sEVs, algunos estudios sugieren también una correlación positiva entre la inflamación y el incremento en la producción y liberación de sEVs, y numerosas evidencias han demostrado el incremento de los niveles de sEVs en patologías inflamatorias como el síndrome metabólico, aterosclerosis y calcificación vascular (Campello *et al.*, 2015; Kapustin y Shanahan, 2016; Freeman *et al.*, 2018). En nuestro trabajo, identificamos a la citoquina IL-1 β como un posible nexo de unión entre dichas patologías y el aumento de liberación de sEVs

Por otra parte, el estudio del papel de la glucosa sobre la producción de EVs en los cultivos de CMLVH demostró que el incremento de la glucosa extracelular no indujo cambios en el número de las EVs, tanto en IEVs, como en sEVs. Esto de nuevo apunta a un papel reducido de la glucosa *per se* en la producción de mecanismos de daño vascular. Sin embargo, tal y como ocurría con la activación del inflammasoma NLRP3, el incremento de la glucosa extracelular potenció los efectos secretores de la citoquina, observándose una producción de IEVs y sEVs significativamente superior a la observada por la citoquina por sí sola. Estos resultados se oponen a algunos estudios en otros tipos celulares, que defienden que el incremento de la glucosa indujo la producción de IEVs (Turner *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019). En cualquier caso, estos hallazgos ponen de manifiesto cómo la combinación de un agente inflamatorio en altas concentraciones de glucosa puede modificar patrones relevantes de comunicación intercelular.

Asimismo, en este trabajo se demostró que la IL-1 β inducía una reducción del tamaño de las sEVs, lo cual contradice estudios en los que las sEVs procedentes de plasma de pacientes diabéticos presentaban un mayor tamaño que las sEVs aisladas de los pacientes controles (García-Contreras *et al.*, 2017).

De nuevo, el aumento de las concentraciones extracelulares de glucosa, aunque no tuvo efecto por sí mismo, potenció la reducción del tamaño de las sEVs inducida por la citoquina. Estos hallazgos contradicen un estudio previo en el que las sEVs procedentes de plasma de pacientes diabéticos presentaban un mayor tamaño que las sEVs aisladas de los pacientes controles (García-Contreras *et al.*, 2017). Otros estudios en células endoteliales indicaron que ni el incremento de la glucosa per se, ni el tratamiento con TNF α afectó al tamaño de las sEVs (de Jong *et al.*, 2012), esto puede deberse probablemente a las diferencias en el origen celular de las sEVs. En cualquier caso, aún no se conoce bien el posible significado fisiopatológico de la variación del tamaño de las sEVs, si bien se está barajando una posible utilidad futura como marcador de la presencia de algunas enfermedades como el síndrome metabólico.

Otro de los hallazgos más novedosos y principales del presente trabajo es la capacidad de la IL-1 β para aumentar la presencia de los componentes del inflammasoma NLRP3 en las EVs de cultivos de CMLVH, incluyendo la proteína NLRP3, la pro-IL-1 β , la caspasa activa, e incluso la propia IL-1 β . En este sentido se observaron diferencias en cuanto a los componentes transportados por las IEVs y los transportados por las sEVs. Así, las sEVs portaban la proteína NLRP3 y la IL-1 β , mientras que las IEVs presentaban además la pro-IL-1 β y la caspasa-1 activa. Esto puede deberse principalmente a las diferencias en los procesos de formación de ambas poblaciones de EVs (Mallocci *et al.*, 2019). Asimismo, algunos estudios sugieren la relación directa entre la activación del inflammasoma NLRP3 y la liberación de EVs, habiéndose descrito algunos activadores comunes de ambos procesos, como los cristales de urato, que producen el daño y rotura de los lisosomas, induciendo a su vez la activación del inflammasoma NLRP3 y de las catepsinas, implicadas en la producción de EVs (Rintahaka *et al.*, 2011). De hecho, algunos estudios sugieren la implicación de la caspasa-1 en el propio proceso de la formación de EVs, a través de la activación del autoantígeno temprano endosomal 1 (EEA1) y su interacción con la familia Rab GTPasas implicadas en el tráfico vesicular en el interior de la célula (Wang *et al.*, 2016; Baroja-Mazo *et al.*, 2019).

Una vez más, el tratamiento de las CMLVH con altas concentraciones de glucosa extracelular en presencia de la IL-1 β hizo que las EVs producidas

presentasen un incremento significativo de los componentes del inflamasoma NLRP3 en el contenido de ambas poblaciones de EVs respecto al observado en las EVs producidas por la IL-1 β por sí sola. Estos hallazgos apoyan diferentes estudios en pacientes con patologías como la obesidad, el síndrome metabólico, y la DM, en los que se observa una alteración en el contenido de las vesículas extracelulares, incluyendo el transporte de mediadores como adipoquinas, citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento en su interior (Mallocci *et al.*, 2019; Noren Hooten y Evans, 2020). En cualquier caso, estos resultados indican de manera muy novedosa que la glucosa a altas concentraciones puede potenciar la exportación de determinados componentes de la respuesta inmune innata a través de las EVs

Quedaba por averiguar si esas EVs formadas por la combinación de la citoquina IL-1 β y las altas concentraciones de glucosa tenían un potencial inflamatorio autocrino o paracrino. En este trabajo se demuestra por primera vez que las IEVs procedentes de CMLVH tratadas con IL-1 β , fueron capaces de generar a su vez una respuesta inflamatoria en cultivos de CMLVH testigo, induciéndose una leve expresión de las proteínas inflamatorias NLRP3 e iNOS, así como la activación significativa del inflamasoma NLRP3 reflejado en la formación del *speck* de ASC. Esta respuesta inflamatoria se exacerbó cuando las IEVs procedían de células que habían sido tratadas con la citoquina bajo elevadas concentraciones de glucosa, tanto en la expresión de ambas proteínas, como en la formación del complejo de ASC. Este fenómeno puede deberse a la mayor cantidad de componentes del inflamasoma, incluida la propia IL-1 β , que transportan las IEVs de CMLVH tratadas con la citoquina y altas concentraciones de glucosa. Estos resultados sientan las bases de que, bajo un ambiente inflamatorio, el músculo liso vascular es capaz de colaborar en la propagación, el desarrollo y el mantenimiento de la inflamación crónica de bajo grado característica en la aterosclerosis y otras enfermedades crónicas, a través de la liberación de EVs. También es importante resaltar que la glucosa puede exagerar esa propagación y contribuir por este mecanismo novedoso a la generación y perpetuación de daño vascular.

En este sentido, diversos estudios demuestran que este transporte de componentes del inflamasoma a través de EVs se ha podido observar en otros

tipos celulares, principalmente en el sistema inmune como forma de propagar una señal inflamatoria con efectos sobre otras células o tejidos diana (Wang *et al.*, 2016; Franklin *et al.*, 2018). De hecho, en uno de ellos se demostró que el transporte de caspasa-1 activa a través de las IEVs procedentes de monocitos era capaz de inducir la apoptosis en células de músculo liso vascular (Sarkar *et al.*, 2009). Además, los elevados niveles de IEVs presentes en las lesiones ateroscleróticas, así como los elevados niveles de expresión de diferentes componentes del inflamasoma NLRP3 en las mismas apoyarían la hipótesis de que estas IEVs colaboran como agentes efectores en el desarrollo y en el mantenimiento de la inflamación crónica de bajo grado característica en la aterosclerosis.

En conjunto, todos estos hallazgos señalan a la citoquina IL-1 β , potenciada por la propia glucosa, como uno de los principales agentes responsables de la inflamación vascular asociada a la vasculopatía diabética. También apuntan al inflamasoma NLRP3 y al transporte de sus componentes, incluida la propia IL-1 β , a través de EVs, como importantes mecanismos implicados en el mantenimiento y propagación de la inflamación sistémica de bajo grado. Por ello, parece fundamental la búsqueda de nuevos abordajes terapéuticos y aproximaciones farmacológicas frente a esta inflamación.

Como se ha recalcado anteriormente, la IL-1 β es una de las principales citoquinas relacionadas con la enfermedad vascular en diabetes, y, de hecho, se ha descrito que IL-6 y la hsPCR, son marcadores subrogados de la actividad biológica de esta citoquina (Ridker, 2016). Recientemente, el ensayo clínico CANTOS ha demostrado por primera vez que el bloqueo farmacológico de la IL-1 β , mediante el anticuerpo monoclonal canakinumab, redujo de manera significativa la aparición de nuevos eventos cardiovasculares en pacientes con DM2, a la vez que se mejoraron los parámetros cardiovasculares en pacientes con infarto agudo de miocardio previo. Además esta reducción de eventos cardiovasculares fue independiente de los niveles de colesterol en sangre, pero sí se acompañó de una reducción de hsPCR, lo cual confirma las características proaterogénicas directas de la IL-1 β , y su papel inflamatorio en el desarrollo de CVD (Ridker *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018; Aday y Ridker, 2018; Everett *et al.*, 2018). Además de fármacos como el anticuerpo monoclonal canakinumab,

existen otros fármacos con diferente mecanismo de acción. En este trabajo se ha utilizado el fármaco anakinra, proteína recombinante análoga al antagonista natural del receptor de IL-1 (IL-1Ra), el cual bloquea el receptor IL-1R impidiendo la señalización subyacente y que destaca por su perfil de seguridad.

En el presente trabajo se ha demostrado la capacidad de anakinra para prevenir la activación de ambas fases de la activación del inflamasoma NLRP3 en células de músculo liso vascular humano estimuladas por la IL-1 β . En la fase de cebado anakinra previno la activación de NF- κ B, así como la síntesis de los componentes del inflamasoma NLRP3, la proteína NLRP3 y la pro-IL-1 β , mientras que, en la fase de activación, anakinra previno completamente el incremento en la expresión de la caspasa-1 y la generación de IL-1 β activa inducido por la propia citoquina. De gran relevancia para el contexto de la DM, anakinra no sólo fue capaz de prevenir los efectos de la citoquina sobre el inflamasoma NLRP3 *per se*, sino que previno completamente la potenciación de estos efectos que tiene lugar bajo elevadas concentraciones de glucosa extracelular en ambas fases de la activación del inflamasoma. Por tanto, el bloqueo farmacológico de los receptores IL-1 no sólo previene el efecto de la citoquina, sino también los efectos potenciadores de la glucosa en un ambiente hiperglucémico.

Estos resultados se relacionan bien con algunos estudios que han demostrado previamente el uso de anakinra en la enfermedad vascular diabética. Larssen y col. describieron cómo la administración de anakinra a pacientes con DM2 mejoraba los niveles glicémicos, y disminuía los niveles séricos de proteínas inflamatorias como IL-6 y hsPCR, aunque no analizaron parámetros cardiovasculares (Larsen *et al.*, 2007). Posteriormente, diversos ensayos clínicos han demostrado la capacidad de anakinra para prevenir y mejorar el desarrollo de complicaciones vasculares y cardiacas (Dinarello *et al.*, 2012; Ridker, 2016; Abbate *et al.*, 2020). De hecho, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad de anakinra para prevenir la disfunción endotelial inducida por la propia IL-1 β en modelos animales de DM1 (Vallejo *et al.*, 2014). Asimismo, se ha demostrado la capacidad de anakinra para frenar la inflamación del músculo liso vascular inducida por la IL-1 β , incluso bajo elevadas concentraciones de glucosa (Peiró *et al.*, 2016).

En este contexto, se compararon también en este trabajo los efectos de anakinra con los efectos de un fármaco inhibidor de la oligomerización de NLRP3 y su unión a ASC, como es el MCC 950 (Shao *et al.*, 2015). Este fármaco previno completamente la fase de activación del inflamasoma impidiendo el incremento en la síntesis de caspasa-1 e IL-1 β activas, inducido por la propia citoquina en células de músculo liso vascular, y también fue capaz de impedir la potenciación de estos efectos bajo elevadas concentraciones de glucosa. Estos hallazgos arrojan luz sobre el inflamasoma NLRP3 y la citoquina IL-1 β como posibles dianas farmacológicas en la inflamación vascular, también en el contexto de la DM, y sobre el MCC 950 como un potencial fármaco de interés en el tratamiento de enfermedades vasculares. Esto vendría también apoyado por diversos estudios que han señalado la capacidad de este fármaco en la prevención de las complicaciones vasculares, como la aterosclerosis, en modelos animales. Sin embargo aún no se han llevado a cabo ensayos clínicos en humanos con este fármaco, por lo que es difícil sacar aún conclusiones sobre sus posibles beneficios y su seguridad para su uso en pacientes (van der Heijden *et al.*, 2017; van Hout *et al.*, 2017; Abbate *et al.*, 2020).

Además, en el presente estudio se ha demostrado que el tratamiento con anakinra previene el incremento en la producción de ambas poblaciones de EVs y su potenciación en elevadas concentraciones de glucosa en cultivos de CMLVH. Asimismo, anakinra no solo fue capaz de inhibir los niveles de EVs producidas, sino que produjo modificaciones en el contenido de las mismas inhibiendo en su totalidad la presencia de los componentes del inflamasoma NLRP3, incluida la propia forma activa de la IL-1 β . Estos resultados suponen un nuevo mecanismo de acción de anakinra, al prevenir la propagación de estas señales inflamatorias a través de las EVs y contribuyendo así a frenar la inflamación sistémica de bajo grado característica de la enfermedad vascular en DM. Estos hallazgos pueden sentar también las bases para la descripción de nuevos mecanismos de acción para los fármacos inhibidores de la IL-1 β , como el canakinumab u otros anticuerpos anti-IL-1 β en fase de desarrollo.

Sin embargo, hay que tener en cuenta también los posibles efectos adversos de estos fármacos. Por ejemplo, anakinra presenta una vida media corta, lo que conlleva administraciones periódicas subcutáneas y reacciones de

hipersensibilidad en el lugar de inyección, así como un elevado coste. Además, el eje inflamatorio NLRP3/ IL-1 β es uno de los principales mecanismos de la inmunidad innata, y por tanto su bloqueo mediante anakinra o MCC950 podría incrementar tanto la propensión a sufrir infecciones, como reducir la capacidad para resolverlas. Por ello son necesarios más estudios para comprobar su perfil de seguridad a largo plazo. De hecho, en el ensayo CANTOS el grupo tratado con canakinumab presentó una mayor predisposición a infecciones debido a que presentaban neutropenia; además, en este grupo se describieron más muertes por infecciones y sepsis que en el grupo placebo (Shah *et al.*, 2018).

Por último, cabe destacar el posible potencial de las EVs liberadas por el músculo liso vascular como posibles herramientas de diagnóstico de la inflamación vascular presente en las lesiones vasculares y en patologías metabólicas con un fuerte componente inflamatorio como la DM. De hecho, cada vez más estudios señalan el papel como biomarcadores de estas EVs aisladas de plasma y a las diferentes proteínas y ácidos nucleicos que contienen, como los miARN, como una potencial herramienta de diagnóstico en enfermedades metabólicas y cardiovasculares como la DM (Li *et al.*, 2016; Akbar *et al.*, 2019; Mallocci *et al.*, 2019). Habría que validar en base al presente trabajo si un mayor contenido de las EVs en proteínas asociadas al inflamatorio NLRP3 puede ser un biomarcador de enfermedad o incluso un marcador de riesgo a corto y medio plazo.

A modo de conclusión, este trabajo permite identificar nuevos mecanismos implicados en el mantenimiento de la inflamación crónica de bajo grado característica de la enfermedad vascular en DM, y apoya los resultados obtenidos en ensayos clínicos como CANTOS, en los que se señala a la IL-1 β en particular, y a la inflamación en general, como verdaderos agentes causantes de la enfermedad vascular diabética antes que a la hiperglucemia *per se*. Al mismo tiempo, este trabajo propone nuevos abordajes farmacológicos contra la IL-1 β , como el uso de anakinra o canakinumab para reducir este daño vascular asociado a la DM, a la vez que profundiza en el mecanismo de acción de este nuevo grupo de fármacos antiinflamatorios biológicos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han estudiado nuevos mecanismos implicados en los efectos proinflamatorios de la IL-1 β en el músculo liso vascular humano y su sinergia con elevadas concentraciones de glucosa extracelular, centrándonos en la implicación del inflamasoma NLRP3, la propia IL-1 β , así como en el perfil secretor de las EVs liberadas por el propio músculo liso vascular. Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. La IL-1 β indujo las dos fases, de la puesta en marcha del inflamasoma NLRP3, cebado y activación, en CMLVH. La elevación de la glucosa no indujo ninguna modificación en la activación de este inflamasoma, pero potenció la activación inducida por la IL-1 β .
2. La IL-1 β promovió la secreción de vesículas extracelulares en CMLVH, tanto IEVs, como sEVs en CMLVH in vitro. Además, aumentó el contenido en componentes del inflamasoma NLRP3 en las propias vesículas. Las altas concentraciones de glucosa no indujeron ningún cambio en el perfil secretor de las CMLVH, pero sí potenciaron tanto la inducción de la secreción de EVs, como el contenido de componentes del inflamasoma NLRP3 en dichas vesículas, inducidos por la IL-1 β .
3. El fármaco biológico anakinra previno los efectos proinflamatorios y prosecretorios inducidos por la IL-1 β en las CMLVH, así como la potenciación de estos efectos bajo altas concentraciones de glucosa.
4. Las IEVs procedentes de CMLVH estimuladas con IL-1 β indujeron una respuesta inflamatoria en CMLVH no tratadas, la cual se vio incrementada cuando las IEVs procedían de CMLVH estimuladas por IL-1 β y elevadas concentraciones de glucosa.

En conjunto, estos resultados indican que las elevadas concentraciones de glucosa no son capaces de ejercer una respuesta inflamatoria *per se* en el músculo liso vascular, pero sí pueden exacerbar los efectos de citoquinas inflamatorias como la IL-1 β sobre la activación de la respuesta inmune innata y concretamente sobre el sistema del inflamasoma NLRP3, o sobre la secreción de vesículas extracelulares. Estos hallazgos proponen nuevos mecanismos mediante los que la inflamación promueve el daño vascular y refuerza a la familia de fármacos antagonistas de la IL-1 β como nuevas opciones terapéuticas para la prevención o atenuación de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes mellitus.

CONCLUSIONS

This work has studied new mechanisms involved in vascular smooth muscle inflammation elicited by IL-1 β and its synergic effect with increased extracellular glucose concentrations, focusing on the implication of NLRP3 inflammasome, the own IL-1 β , and the secretory profile of extracellular vesicles released by the vascular smooth muscle itself. The main conclusions drawn from this work are:

1. IL-1 β was able to induce both phases of NLRP3 inflammasome induction, priming and activation, in HASMC. The increase of glucose did not induce any modification on this activation, but it exacerbated the activation elicited by IL-1 β .
2. IL-1 β promoted the production and release of extracellular vesicles in HASMC in vitro, both IEVs and sEVs. Besides, the cytokine increased the cargo in NLRP3 components of both kinds of EVs. The increase of glucose concentration did not exhibit any effect over HASMC secretory profile, but it exacerbated the induction of EVs secretion, as the presence of NLRP3 inflammasome components in their cargo induced by IL-1 β .
3. The biologic drug anakinra prevented not only the proinflammatory and prosecretory effects of IL-1 β on HASMC, but also its exacerbation in presence of high glucose concentration.
4. The IEVs from HASMC treated with IL-1 β exerted an inflammatory response in naïve HASMC. This inflammatory response was markedly higher when IEVs were from HASMC treated with IL-1 β and high glucose at the same time.

Conclusions

In general terms, these results indicate that high glucose concentration is not able to exert any inflammatory response on vascular smooth muscle *per se*, but it can potentiate the inflammatory effects of certain cytokines, such as IL-1 β in innate immune response, and specifically on NLRP3 inflammasome, and the secretion of extracellular vesicles. Also, this work proposes new mechanisms through which inflammation promotes vascular damage and reinforces the drugs which antagonize IL-1 β as new therapeutic approaches to choose in attenuation or prevention of diabetes mellitus associated vascular complications.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate, A., Toldo, S., Marchetti, C., Kron, J., Van Tassell, B.W. & Dinarello, C.A. (2020). Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 126(9): 1260-1280. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315937.
- Abels, E.R. & Breakefield, X.O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3): 301-312. doi: 10.1007/s10571-016-0366-z.
- Aday, A.W. & Ridker, P.M. (2018). Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5: 62. doi: 10.3389/fcvm.2018.00062.
- Agouni, A., Ducluzeau, P., Benameur, T., Faure, S., Sladkova, M., Duluc, L., Leftheriotis, G., Pechanova, O., Delibegovic, M., Martinez, M.C. & Andriantsitohaina, R. (2011). Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. *PloS One*, 6(11): e27809. doi: 10.1371/journal.pone.0027809.
- Akbar, N., Azzimato, V., Choudhury, R.P. & Aouadi, M. (2019). Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia*, 62(12): 2179-2187. doi: 10.1007/s00125-019-05014-5.
- Alexander, M.R., Murgai, M., Moehle, C.W. & Owens, G.K. (2012). Interleukin-1 β modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF- κ B-dependent mechanisms. *Physiological Genomics*, 44(7): 417-429. doi: 10.1152/physiolgenomics.00160.2011.
- Altenhöfer, S., Radermacher, K.A., Kleikers, P.W.M., Wingler, K. & Schmidt, Harald H. H. W. (2015). Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(5): 406-427. doi: 10.1089/ars.2013.5814.
- American Diabetes Association (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36 Suppl 1: 67. doi: 10.2337/dc13-S067.
- American Diabetes Association (2019). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42(Suppl 1): S13-S28. doi: 10.2337/dc19-S002.
- Avogaro, A. & Fadini, G.P. (2019). Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists. *International Journal of Cardiology*, 291: 29-35. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.02.030.
- Azcutia, V., Abu-Taha, M., Romacho, T., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Luscinskas, F.W., Rodríguez-Mañás, L., 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. doi: 10.1371/journal.pone.0010091.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. & David, G. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7): 677-685. doi: 10.1038/ncb2502.

- Baldrighi, M., Mallat, Z. & Li, X. (2017). NLRP3 inflammasome pathways in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 267: 127-138. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.027.
- Balogh, E., Tóth, A., Méhes, G., Trencsényi, G., Paragh, G. & Jeney, V. (2019). Hypoxia Triggers Osteochondrogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells in an HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)-Dependent and Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(6): 1088-1099. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312509.
- Baroja-Mazo, A., Compan, V., Martín-Sánchez, F., Tapia-Abellán, A., Couillin, I. & Pelegrín, P. (2019). Early endosome autoantigen 1 regulates IL-1 β release upon caspase-1 activation independently of gasdermin D membrane permeabilization. *Scientific Reports*, 9(1): 5788. doi: 10.1038/s41598-019-42298-4.
- Brodsky, S.V., Zhang, F., Nasjletti, A. & Goligorsky, M.S. (2004). Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(5): H1910-H1915. doi: 10.1152/ajpheart.01172.2003.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature (London)*, 414(6865): 813-820. doi: 10.1038/414813a.
- Burger, D., Montezano, A.C., Nishigaki, N., He, Y., Carter, A. & Touyz, R.M. (2011). Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(8): 1898-1907. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.222703.
- Burnley-Hall, N., Willis, G., Davis, J., Rees, D.A. & James, P.E. (2017). Nitrite-derived nitric oxide reduces hypoxia-inducible factor 1 α -mediated extracellular vesicle production by endothelial cells. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 63: 1-12. doi: 10.1016/j.niox.2016.12.005.
- Campello, E., Zabeo, E., Radu, C.M., Spiezia, L., Gavasso, S., Fadin, M., Woodhams, B., Vettor, R. & Simioni, P. (2015). Hypercoagulability in overweight and obese subjects who are asymptomatic for thrombotic events. *Thrombosis and Haemostasis*, 113(1): 85-96. doi: 10.1160/TH14-02-0156.
- Charles Faselis, Alexandra Katsimardou, Konstantinos Imprialos, Pavlos Deligkaris, Manolis Kallistratos & Kiriakos Dimitriadis (2020). Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2): 117-124. doi: 10.2174/1570161117666190502103733.
- Chatenoud, L., Warncke, K. & Ziegler, A.-. (2012). Clinical Immunologic Interventions for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8): a007716. doi: 10.1101/cshperspect.a007716.
- Chen, T., Yen, C., Lu, Y., Shi, C., Hsieh, R., Chang, S. & Chen, C. (2020). The antagonism of 6-shogaol in high-glucose-activated NLRP3 inflammasome and consequent calcification of human artery smooth muscle cells. *Cell & Bioscience*, 10: 5. doi: 10.1186/s13578-019-0372-1.
- Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, 19(2): 43-51. doi: 10.1016/j.tcb.2008.11.003.

- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C. & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24): 5553-5565. doi: 10.1242/jcs.128868.
- Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1): 255-289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Cooper, M.E., Bonnet, F., Oldfield, M. & Jandeleit-Dahm, K. (2001). *Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview*. Elsevier Ind. doi: 10.1016/S0895-7061(00)01323-6.
- Cruz, N.G., Sousa, L.P., Sousa, M.O., Pietrani, N.T., Fernandes, A.P. & Gomes, K.B. (2013). The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 99(2): 85-92. doi: 10.1016/j.diabres.2012.09.003.
- Cypryk, W., Nyman, T.A. & Matikainen, S. (2018). From Inflammasome to Exosome—Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response?. *Frontiers in Immunology*, 9: 2188. doi: 10.3389/fimmu.2018.02188.
- Das, A. & Mukhopadhyay, S. (2011). The evil axis of obesity, inflammation and type-2 diabetes. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 11(1): 23.
- de Jong, O.G., Verhaar, M.C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R.M., Gucek, M. & van Balkom, B.W.M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(1): 18396-n/a. doi: 10.3402/jev.v1i0.18396.
- Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M. & Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*, 88(11): 1254-1264. doi: 10.2522/ptj.20080020.
- Dimitris Tousoulis, Anna-Maria Kampoli & Christodoulos Stefanadis (2012). Diabetes Mellitus and Vascular Endothelial Dysfunction: Current Perspectives. *Current Vascular Pharmacology*, 10(1): 19-32. doi: 10.2174/157016112798829797.
- Dinarello, C.A., Simon, A. & van der Meer, Jos W. M (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(8): 633-652. doi: 10.1038/nrd3800.
- Ding, S., Xu, S., Ma, Y., Liu, G., Jang, H. & Fang, J. (2019). Modulatory Mechanisms of the NLRP3 Inflammasomes in Diabetes. *Biomolecules (Basel, Switzerland)*, 9(12): 850. doi: 10.3390/biom9120850.
- Distel, R.J. & Ivanov, A.R. (2012). Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Frontiers in Physiology* doi: 10.3389/fphys.2012.00354.
- Donath, M.Y. & Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology*, 11(2): 98-107. doi: 10.1038/nri2925.
- Donato, A.J., Morgan, R.G., Walker, A.E. & Lesniewski, L.A. (2015). Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 89(Pt B): 122-135. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.021.

Dong, G., MAO, Q., XIA, W., XU, Y., WANG, J., XU, L. & JIANG, F. (2016). PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncology Letters*, 11(3): 1980-1986. doi: 10.3892/ol.2016.4168.

Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T. & Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5876): 674-677. doi: 10.1126/science.1156995.

Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K. & Sobey, C.G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(6): 453-471. doi: 10.1038/nrd3403.

Durcin, M., Fleury, A., Taillebois, E., Hilairet, G., Krupova, Z., Henry, C., Truchet, S., Trötz Müller, M., Köfeler, H., Mabileau, G., Hue, O., Andriantsitohaina, R., Martin, P. & Le Lay, S. (2017). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1): 1305677-22. doi: 10.1080/20013078.2017.1305677.

Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A.J. & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 105(2): 141-150. doi: 10.1016/j.diabres.2014.04.006.

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. doi: 10.1016/j.jacc.2018.03.002.

Federici, S., Martini, A. & Gattorno, M. (2013). The Central Role of Anti-IL-1 Blockade in the Treatment of Monogenic and Multi-Factorial Autoinflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 4: 351. doi: 10.3389/fimmu.2013.00351.

Fisman, E.Z. (2008). Biomarkers in Cardiovascular Diabetology: Interleukins and Matrixins. In: *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets*. S. Karger AG, Basel, Switzerland, Feb, pp. 44-64 doi:10.1159/000115187.

Fitzgerald, W., Freeman, M.L., Lederman, M.M., Vasilieva, E., Romero, R. & Margolis, L. (2018). A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. *Scientific Reports*, 8(1): 8973-11. doi: 10.1038/s41598-018-27190-x.

Flamant, S. & Tamarat, R. (2016). Extracellular Vesicles and Vascular Injury: New Insights for Radiation Exposure. *Radiation Research*, 186(2): 203-218. doi: 10.1667/RR14482.1.

Folco, E.J., Sukhova, G.K., Quillard, T. & Libby, P. (2014). Moderate hypoxia potentiates interleukin-1 β production in activated human macrophages. *Circulation Research*, 115(10): 875-883. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304437.

Franklin, B.S., Latz, E. & Schmidt, F.I. (2018). The intra- and extracellular functions of ASC specks. *Immunological Reviews*, 281(1): 74-87. doi: 10.1111/imr.12611.

- Freeman, D.W., Noren Hooten, N., Eitan, E., Green, J., Mode, N.A., Bodogai, M., Zhang, Y., Lehrmann, E., Zonderman, A.B., Biragyn, A., Egan, J., Becker, K.G., Mattson, M.P., Ejiogu, N. & Evans, M.K. (2018). Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes (New York, N.Y.)*, 67(11): 2377-2388. doi: 10.2337/db17-1308.
- Fu, L., Hu, X., Lin, Z., Chang, F., Ou, Z., Wang, Z. & Ou, J. (2015). Circulating microparticles from patients with valvular heart disease and cardiac surgery inhibit endothelium-dependent vasodilation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 150(3): 666-672. doi: 10.1016/j.jtcvs.2015.05.069.
- Gabay, C., Lamacchia, C. & Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, 6(4): 232-241. doi: 10.1038/nrrheum.2010.4.
- Garcia-Contreras, M., Shah, S.H., Tamayo, A., Robbins, P.D., Goldberg, R.B., Mendez, A.J. & Ricordi, C. (2017). *Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes*. Springer Science and Business Media LLC, (-07-20) doi: 10.1038/s41598-017-05787-y.
- Giacco, F. & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9): 1058-1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
- Goldberg, R.B. (2009). Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(9): 3171-3182. doi: 10.1210/jc.2008-2534.
- Gray, S.P., Di Marco, E., Okabe, J., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Montezano, A.C., de Haan, J.B., Koulis, C., El-Osta, A., Andrews, K.L., Chin-Dusting, J.P.F., Touyz, R.M., Wingler, K., Cooper, M.E., Schmidt, Harald H. H. W. & Jandeleit-Dahm, K.A. (2013). NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Circulation*, 127(18): 1888-1902. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.132159.
- Grebe, A., Hoss, F. & Latz, E. (2018). NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 122(12): 1722-1740. doi: 10.1161/circresaha.118.311362.
- Guariguata, L., Linnenkamp, U., Beagley, J., Whiting, D.R. & Cho, N.H. (2014). Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2): 176-185. doi: 10.1016/j.diabres.2013.11.003.
- Gustafson, D., Veitch, S. & Fish, J.E. (2017). Extracellular vesicles as protagonists of diabetic cardiovascular pathology. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4: 71. doi: 10.3389/fcvm.2017.00071.
- Guzik, T.J. & Cosentino, F. (2018). Epigenetics and Immunometabolism in Diabetes and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(3): 257-274. doi: 10.1089/ars.2017.7299.
- Haas, A.V. & McDonnell, M.E. (2018). Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 47(1): 51-63. doi: 10.1016/j.ecl.2017.10.010.

- He, W., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z., Zhong, C. & Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Research*, 25(12): 1285-1298. doi: 10.1038/cr.2015.139.
- Helal, I., Zerelli, L., Krid, M., ElYounsi, F., Ben Maiz, H., Zouari, B., Adelmoula, J. & Kheder, A. (2012). Comparison of C-reactive protein and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients on hemodialysis. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 23(3): 477-483.
- Henning, R.J. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiology*, 14(6): 491-509. doi: 10.2217/fca-2018-0045.
- 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 and Metabolism*, 26(10): 551-563. doi: 10.1016/j.tem.2015.08.001.
- Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J.G., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R.A. & Dimmeler, S. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14(3): 249-256. doi: 10.1038/ncb2441.
- Hernández, A., Geng, Y., Sepúlveda, R., Solís, N., Torres, J., Arab, J.P., Barrera, F., Cabrera, D., Moshage, H. & Arrese, M. (2020). Chemical hypoxia induces pro-inflammatory signals in fat-laden hepatocytes and contributes to cellular crosstalk with Kupffer cells through extracellular vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(6): 165753. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165753.
- Hewinson, J., Moore, S.F., Glover, C., Watts, A.G. & MacKenzie, A.B. (2008). A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(12): 8410-8420. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.8410.
- 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. doi: 10.1002/jcp.25930.
- Hoss, F., Rodriguez-Alcazar, J.F. & Latz, E. (2016). Assembly and regulation of ASC specks. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 74(7): 1211-1229. doi: 10.1007/s00018-016-2396-6.
- Hosseinkhani, B., Kuypers, S., van den Akker, Nynke M. S., Molin, D.G.M. & Michiels, L. (2018). Extracellular Vesicles Work as a Functional Inflammatory Mediator Between Vascular Endothelial Cells and Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 9: 1789. doi: 10.3389/fimmu.2018.01789.
- Hulsmans, M. & Holvoet, P. (2013). MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular Research*, 100(1): 7-18. doi: 10.1093/cvr/cvt161.
- Im, K. (2018). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: *Biobanking*. Springer New York, New York, NY, Dec 12, pp. 299-311 doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_26.

Imai, Y., Dobrian, A.D., Weaver, J.R., Butcher, M.J., Cole, B.K., Galkina, E.V., Morris, M.A., Taylor-Fishwick, D.A. & Nadler, J.L. (2013). Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 15(s3): 117-129. doi: 10.1111/dom.12161.

Jo, E., Kim, J.K., Shin, D. & Sasakawa, C. (2016). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(2): 148-159. doi: 10.1038/cmi.2015.95.

Kakar, P. & Lip, G.Y. (2014). Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 5(3): 441-450. doi: 10.1586/14779072.5.3.441.

Kalra, H., Drummen, G.P.C. & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2): 170. doi: 10.3390/ijms17020170.

Kapustin, A.N. & Shanahan, C.M. (2016). Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation. *The Journal of Physiology*, 594(11): 2905-2914. doi: 10.1113/jp271340.

Kapustin, A.N., Davies, J.D., Reynolds, J.L., McNair, R., Jones, G.T., Sidibe, A., Schurgers, L.J., Skepper, J.N., Proudfoot, D., Mayr, M. & Shanahan, C.M. (2011). Calcium Regulates Key Components of Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Matrix Vesicles to Enhance Mineralization. *Circulation Research*, 109(1): E1-U41. doi: 10.1161/circresaha.110.238808.

Kayagaki, N., Wong, M.T., Stowe, I.B., Ramani, S.R., Gonzalez, L.C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W.P., Muszynski, A., Forsberg, L.S., Carlson, R.W. & Dixit, V.M. (2013). Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 341(6151): 1246-1249. doi: 10.1126/science.1240248.

Kranendonk, M.E.G., Visseren, F.L.J., van Herwaarden, J.A., Nolte-'t Hoen, Esther N. M., de Jager, W., Wauben, M.H.M. & Kalkhoven, E. (2014). Effect of extracellular vesicles of human adipose tissue on insulin signaling in liver and muscle cells. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(10): 2216-2223. doi: 10.1002/oby.20847.

Krohn, J.B., Hutcheson, J.D., Martínez-Martínez, E. & Aikawa, E. (2016). Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms. *The Journal of Physiology*, 594(11): 2895-2903. doi: 10.1113/JP271338.

Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet, J.M. & Martínez, M.C. (2001). Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca²⁺ entry: role of actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7): 5134-5139. doi: 10.1074/jbc.M007924200.

Lafuente, N., Matesanz, N., Azcutia, V., Romacho, T., Nevado, J., Rodriguez-Manas, L., Moncada, S., Peiro, C. & Sanchez-Ferrer, C.F. (2008). The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *Journal of Hypertension*, 26(3): 478-485. doi: 10.1097/HJH.0b013e3282f331fb [doi].

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. *The New England Journal of Medicine*, 356(15): 1517-1526. doi: 10.1056/NEJMoa065213.

León-Pedroza, J.I., González-Tapia, L.A., del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G. & González-Chávez, A. (2015). Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía Y Cirujanos*, 83(6): 543-551. doi: 10.1016/j.circir.2015.05.041.

Li, M., Zhang, T., Wu, X., Chen, Y. & Sun, L. (2019). High glucose provokes microvesicles generation from glomerular podocytes via NOX4/ROS pathway. *Bioscience Reports*, 39(BSR20192554) doi: 10.1042/BSR20192554.

Li, S., Wei, J., Zhang, C., Li, X., Meng, W., Mo, X., Zhang, Q., Liu, Q., Ren, K., Du, R., Tian, H. & Li, J. (2016). Cell-Derived Microparticles in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 39(6): 2439-2450. doi: 10.1159/000452512.

Liu, K., Fang, C., Shen, Y., Liu, Z., Zhang, M., Ma, B. & Pang, X. (2017). Hypoxia-inducible factor 1a induces phenotype switch of human aortic vascular smooth muscle cell through PI3K/AKT/AEG-1 signaling. *Oncotarget*, 8(20): 33343-33352. doi: 10.18632/oncotarget.16448.

Lontchi-Yimagou, E., Sobngwi, E., Matsha, T.E. & Kengne, A.P. (2013). Diabetes Mellitus and Inflammation. *Current Diabetes Reports*, 13(3): 435-444. doi: 10.1007/s11892-013-0375-y.

Lopez-Castejon, G. & Brough, D. (2011). Understanding the mechanisms of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 32: 1. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.10.004.

Lötvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzás, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M.H., Witwer, K.W. & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3: 26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.

Loukovaara, S., Piippo, N., Kinnunen, K., Hytti, M., Kaarniranta, K. & Kauppinen, A. (2017). NLRP3 inflammasome activation is associated with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmologica (Oxford, England)*, 95(8): 803-808. doi: 10.1111/aos.13427.

Low Wang, C.C., Hess, C.N., Hiatt, W.R. & Goldfine, A.B. (2016). *Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes – Mechanisms, Management, and Clinical Considerations*. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022194.

Mallici, M., Perdomo, L., Veerasamy, M., Andriantsitohaina, R., Simard, G. & Martínez, M.C. (2019). Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(6): 813-856. doi: 10.1089/ars.2017.7265.

- Maloberti, A., Vallerio, P., Triglione, N., Occhi, L., Panzeri, F., Bassi, I., Pansera, F., Piccinelli, E., Peretti, A., Garatti, L., Palazzini, M., Sun, J., Grasso, E. & Giannattasio, C. (2019). Vascular Aging and Disease of the Large Vessels: Role of Inflammation. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 26(3): 175-182. doi: 10.1007/s40292-019-00318-4.
- Manigrasso, M.B., Juranek, J., Ramasamy, R. & Schmidt, A.M. (2013). Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(1): 15-22. doi: 10.1016/j.tem.2013.08.002.
- Martinez, M.C., Tual-Chalot, S., Leonetti, D. & Andriantsitohaina, R. (2011). Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences (Regular Ed.)*, 32(11): 659-665. doi: 10.1016/j.tips.2011.06.005.
- Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L.A., Harris, J., Coll, R.C., Mills, K.H.G., Mok, K.H., Newsholme, P., Nuñez, G., Yodoi, J., Kahn, S.E., Lavelle, E.C. & O'Neill, L.A.J. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, 11(10): 897-904. doi: 10.1038/ni.1935.
- Milbank, E., Soleti, R., Martinez, E., Lahouel, B., Hilairat, G., Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R. & Noireaud, J. (2015). Microparticles from apoptotic RAW 264.7 macrophage cells carry tumour necrosis factor- α functionally active on cardiomyocytes from adult mice. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1): 28621-n/a. doi: 10.3402/jev.v4.28621.
- Mohammedi, K., Woodward, M., Marre, M., Colagiuri, S., Cooper, M., Harrap, S., Mancia, G., Poulter, N., Williams, B., Zoungas, S. & Chalmers, J. (2017). Comparative effects of microvascular and macrovascular disease on the risk of major outcomes in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 16(1): 95. doi: 10.1186/s12933-017-0574-y.
- Mokas, S., Larivière, R., Lamalice, L., Gobeil, S., Cornfield, D.N., Agharazii, M. & Richard, D.E. (2016). Hypoxia-inducible factor-1 plays a role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Kidney International*, 90(3): 598-609. doi: 10.1016/j.kint.2016.05.020.
- Nathan, D.M. (2014). The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. *Diabetes Care*, 37(1): 9-16. doi: 10.2337/dc13-2112.
- Newsholme, P., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Carlessi, R. & de Bittencourt, Paulo Ivo Homem (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*, 473(24): 4527-4550. doi: 10.1042/bcj20160503c.
- Niu, C., Wang, X., Zhao, M., Cai, T., Liu, P., Li, J., Willard, B., Zu, L., Zhou, E., Li, Y., Pan, B., Yang, F. & Zheng, L. (2016). Macrophage Foam Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Adhesion. *Journal of the American Heart Association*, 5(10) doi: 10.1161/JAHA.116.004099.

Nomura, S., Suzuki, M., Katsura, K., Xie, G.L., Miyazaki, Y., Miyake, T., Kido, H., Kagawa, H. & Fukuhara, S. (1995). Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 116(2): 235-240. doi: 10.1016/0021-9150(95)05551-7.

Noren Hooten, N. & Evans, M.K. (2020). Extracellular Vesicles as Signaling Mediators in Type 2 Diabetes Mellitus. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 318(6): C1189-C1199. doi: 10.1152/ajpcell.00536.2019.

O'Shea, J.J. (2015). 13 - Cytokines. In: Hochberg, M.C., Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E. y Weisman, M.H. (Eds.), *Rheumatology (Sixth Edition)*. Mosby, Philadelphia, January 1, pp. 99-112.

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 (Philadelphia, Pa.)*, 76(1): 25-37. doi: 10.1016/j.cyto.2015.06.017.

Patterson, C.C., Karuranga, S., Salpea, P., Saeedi, P., Dahlquist, G., Soltesz, G. & Ogle, G.D. (2019). Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157: 107842. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107842.

Pavillard, L.E., Marín-Aguilar, F., Bullon, P. & Cordero, M.D. (2018). Cardiovascular diseases, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns. *Pharmacological Research*, 131: 44-50. doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.018.

Peiró, C., Matesanz, N., Nevado, J., Lafuente, N., Cercas, E., Azcutia, V., Vallejo, S., Rodríguez-Mañas, L. & Sánchez-Ferrer, C.F. (2003). Glycosylated human oxyhaemoglobin activates nuclear factor- κ B and activator protein-1 in cultured human aortic smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 140(4): 681-690. doi: 10.1038/sj.bjp.0705483.

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. doi: 10.1186/s12933-016-0397-2.

Peiró, C., Lorenzo, Ó, Carraro, R. & Sánchez-Ferrer, C.F. (2017). IL-1 β Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 363. doi: 10.3389/fphar.2017.00363.

Petrie, J.R., Guzik, T.J. & Touyz, R.M. (2018). Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Canadian Journal of Cardiology*, 34(5): 575-584. doi: 10.1016/j.cjca.2017.12.005.

Prasad, M., Chen, E.W., Toh, S. & Gascoigne, N.R.J. (2020). Autoimmune responses and inflammation in type 2 diabetes. *Journal of Leukocyte Biology*, 107(5): 739-748. doi: 10.1002/JLB.3MR0220-243R.

Prattichizzo, F. (2017). Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes doi: 10.1016/j.arr.2017.10.003.

Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G.R. (2007). Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology (1950)*, 179(3): 1913-1925. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1913.

Rahman, S., Rahman, T., Ismail, A.A. & Rashid, A.R.A. (2007). Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 9(6): 767-780. doi: 10.1111/j.1463-1326.2006.00655.x.

Record, M., Carayon, K., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1841(1): 108-120. doi: 10.1016/j.bbali.2013.10.004.

Rheinheimer, J., Souza, B.M.d., Cardoso, N.S., Bauer, A.C. & Crispim, D. (2017). Metabolism. *Metabolism*, 74: 1-9.

Ridker, P. (2019). Anticytokine Agents: Targeting Interleukin Signaling Pathways for the Treatment of Atherothrombosis. *Circulation Research*, 124(3): 437-450. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313129.

Ridker, P.M. (2016). *From CRP to IL-6 to IL-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection*. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306656.

Ridker, P.M., Everett, B.M., Thuren, T., MacFadyen, J.G., Chang, W.H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S.D., Kastelein, J.J.P., Cornel, J.H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P.R.F., Troquay, R.P.T., Libby, P. & Glynn, R.J. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England Journal of Medicine*, 377(12): 1119-1131. doi: 10.1056/nejmoa1707914.

Rintahaka, J., Lietzén, N., Öhman, T., Nyman, T.A. & Matikainen, S. (2011). Recognition of cytoplasmic RNA results in cathepsin-dependent inflammasome activation and apoptosis in human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(5): 3085-3092. doi: 10.4049/jimmunol.1002051.

Rizzoni, D. & Rosei, E.A. (2009). Small artery remodeling in diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(8): 587-592. doi: 10.1016/j.numecd.2009.03.011.

Romacho, T., Azcutia, V., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Cercas, E., Nevado, J., Carraro, R., Rodríguez-Mañas, L., Sánchez-Ferrer, C.F. & Peiró, 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. doi: 10.1007/s00125-009-1509-2.

Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., Cannata, P., Romero, A., San Hipólito-Luengo, A., Gómez-Cerezo, J.F., Peiró, C. & Sánchez-Ferrer, C.F. (2020). Visfatin/eNamt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Scientific Reports*, 10(1): 5386. doi: 10.1038/s41598-020-62190-w.

Romero, A., San Hipólito-Luengo, Á, Villalobos, L.A., Vallejo, S., Valencia, I., Michalska, P., Pajuelo-Lozano, N., Sánchez-Pérez, I., León, R., Bartha, J.L., Sanz, M.J., Erusalimsky, J.D., Sánchez-Ferrer, C.F., Romacho, T. & Peiró, C. (2019). The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging Cell*, 18(3): e12913-n/a. doi: 10.1111/ace1.12913.

Rovira-Llopis, S., Apostolova, N., Bañuls, C., Muntané, J., Rocha, M. & Victor, V.M. (2018). Mitochondria, the NLRP3 Inflammasome, and Sirtuins in Type 2 Diabetes: New Therapeutic Targets. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(8): 749-791. doi: 10.1089/ars.2017.7313.

Ruotsalainen, E., Vauhkonen, I., Salmenniemi, U., Pihlajamäki, J., Punnonen, K., Kainulainen, S., Jalkanen, S., Salmi, M. & Laakso, M. (2007). Markers of endothelial dysfunction and low-grade inflammation are associated in the offspring of type 2 diabetic subjects. *Atherosclerosis*, 197(1): 271-277. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.021.

Sabatier, F., Darmon, P., Hugel, B., Combes, V., Sanmarco, M., Velut, J., Arnoux, D., Charpiot, P., Freyssinet, J., Oliver, C., Sampol, J. & Dignat-George, F. (2002). Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*, 51(9): 2840-2845. doi: 10.2337/diabetes.51.9.2840.

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A.A., Ogurtsova, K., Shaw, J.E., Bright, D. & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157: 107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.

Saltiel, A.R. & Olefsky, J.M. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(1): 1-4. doi: 10.1172/jci92035.

Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R. & Wewers, M.D. (2009). Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PloS One*, 4(9): e7140. doi: 10.1371/journal.pone.0007140.

Schroder Kate, Zhou Rongbin & Tschopp Jurg (2010). The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger?. *Science*, 327(5963): 296-300.

Schroder, K. & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell (Cambridge)*, 140(6): 821-832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.

Shah, S.R., Abbasi, Z., Fatima, M., Ochani, R.K., Shahnawaz, W., Asim Khan, M. & Shah, S.A. (2018). Canakinumab and cardiovascular outcomes: results of the CANTOS trial. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 8(1): 21-22. doi: 10.1080/20009666.2018.1428023.

Shahzad, K., Bock, F., Dong, W., Wang, H., Kopf, S., Kohli, S., Al-Dabet, M.M., Ranjan, S., Wolter, J., Wacker, C., Biemann, R., Stoyanov, S., Reymann, K., Söderkvist, P., Groß, O., Schwenger, V., Pahernik, S., Nawroth, P.P., Gröne, H., Madhusudhan, T. & Isermann, B. (2015). Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney International*, 87(1): 74-84. doi: 10.1038/ki.2014.271.

- Shao, B., Xu, Z., Han, B., Su, D. & Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 262. doi: 10.3389/fphar.2015.00262.
- Sharma, A., Tate, M., Mathew, G., Vince, J.E., Ritchie, R.H. & de Haan, J.B. (2018). Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications. *Frontiers in Physiology*, 9: 114. doi: 10.3389/fphys.2018.00114.
- Sharma, A., Choi, J.S.Y., Stefanovic, N., Sharea, A., Simpson, D.S., Mukhamedova, N., Jandeleit-Dahm, K., Murphy, A.J., Sviridov, D., Vince, J.E., Ritchie, R.M. & de Haan, J.B. (2020). Specific NLRP3 Inhibition Protects Against Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes* doi: 10.2337/db20-0357.
- Sheehan, A.L., Carrell, S., Johnson, B., Stanic, B., Banfi, B. & Miller, F.J. (2007). Role for Nox1 NADPH Oxidase in Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 216(2): 321-326. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.028.
- Shi, H., Zhang, Z., Wang, X., Li, R., Hou, W., Bi, W. & Zhang, X. (2015). Inhibition of autophagy induces IL-1 β release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4): 1071-1076. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.060.
- 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. doi: 10.1002/jcp.24797.
- Shobeiri, N. & Bendeck, M.P. (2017). Interleukin-1 β Is a Key Biomarker and Mediator of Inflammatory Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(2): 179-180. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308724.
- Shoelson, S.E. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8): 2308. doi: 10.1172/JCI29069E1.
- Simoncini, S., Njock, M., Robert, S., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Harlé, J., Nguyen, C., Dignat-George, F. & Anfosso, F. (2009). TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circulation Research*, 104(8): 943-951. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183285.
- Sims, E.A.H. (1973). Endocrine and Metabolic Effects of Experimental Obesity in Man. In: *Recent Progress in Hormone Research*. Elsevier Inc, pp. 457-496 doi:10.1016/B978-0-12-571129-6.50016-6.
- Strain, W.D. & Paldanius, P.M. (2018). Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1): 57. doi: 10.1186/s12933-018-0703-2.
- Subramanian, S. & Hirsch, I.B. (2018). Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 47(1): 65-79. doi: 10.1016/j.ecl.2017.10.012.

Swen, J., Guchelaar, H., Baak-Pablo, R., Assendelft, W. & Wessels, J. (2011). Genetic risk factors for type 2 diabetes mellitus and response to sulfonylurea treatment. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(8): 461-468. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283478173.

Taube, A., Schlich, R., Sell, H., Eckardt, K. & Eckel, J. (2012). Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 302(11): H2148-H2165. doi: 10.1152/ajpheart.00907.2011.

Thompson, J.A., Larion, S., Mintz, J.D., Belin de Chantemèle, Eric J., Fulton, D.J. & Stepp, D.W. (2017). Genetic Deletion of NADPH Oxidase 1 Rescues Microvascular Function in Mice with Metabolic Disease. *Circulation Research*, 121(5): 502-511. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309965.

Tokarz, A., Szućcik, I., Kuśnierz-Cabala, B., Kapusta, M., Konkolewska, M., Żurkowski, A., Georgescu, A. & Stępień, E. (2015). Extracellular vesicles participate in the transport of cytokines and angiogenic factors in diabetic patients with ocular complications. *Folia Medica Cracoviensia*, 55(4): 35-48.

Turner, M., Reid, L., Munkonda, M. & Burger, D. (2016). OS 02-03 Effecto of high glucose exposure on endothelial microparticle formation and composition. *Journal of Hypertension*, 34: e48. doi: 10.1097/01.hjh.0000499978.32917.c0.

UKPDS (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *The Lancet (British Edition)*, 352(9131): 837-853.

Välimäki, E., Cypryk, W., Virkanen, J., Nurmi, K., Turunen, P.M., Eklund, K.K., Åkerman, K.E., Nyman, T.A. & Matikainen, S. (2016). Calpain Activity Is Essential for ATP-Driven Unconventional Vesicle-Mediated Protein Secretion and Inflammasome Activation in Human Macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 197(8): 3315-3325. doi: 10.4049/jimmunol.1501840.

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. doi: 10.1186/s12933-014-0158-z.

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-Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(8): 1457-1461. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309575.

van Greevenbroek, M. M. J., Schalkwijk, C.G. & Stehouwer, C.D.A. (2013). Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Netherlands Journal of Medicine*, 71(4): 174-187.

van Hezel, M.E., Nieuwland, R., van Bruggen, R. & Juffermans, N.P. (2017). The Ability of Extracellular Vesicles to Induce a Pro-Inflammatory Host Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6): 1285. doi: 10.3390/ijms18061285.

van Hout, Gerardus P. J., Bosch, L., Ellenbroek, Guilielmus H. J. M., de Haan, J.J., van Solinge, W.W., Cooper, M.A., Arslan, F., de Jager, Saskia C. A., Robertson, A.A.B., Pasterkamp, G. & Hofer, I.E. (2017). 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. doi: 10.1093/eurheartj/ehw247.

Wang, L., Fu, H., Nanayakkara, G., Li, Y., Shao, Y., Johnson, C., Cheng, J., Yang, W.Y., Yang, F., Lavalley, M., Xu, Y., Cheng, X., Xi, H., Yi, J., Yu, J., Choi, E.T., Wang, H. & Yang, X. (2016). Novel extracellular and nuclear caspase-1 and inflammasomes propagate inflammation and regulate gene expression: a comprehensive database mining study. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1): 122. doi: 10.1186/s13045-016-0351-5.

Wang, X., Huang, W., Liu, G., Cai, W., Millard, R.W., Wang, Y., Chang, J., Peng, T. & Fan, G. (2014). Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 74: 139-150. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.05.001.

Wei, Y., Wang, D., Jin, F., Bian, Z., Li, L., Liang, H., Li, M., Shi, L., Pan, C., Zhu, D., Chen, X., Hu, G., Liu, Y., Zhang, C. & Zen, K. (2017). Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nature Communications*, 8: 14041. doi: 10.1038/ncomms14041.

Wiklander, O.P.B., Brennan, M.A., Lötvall, J., Breakefield, X.O. & Andaloussi, S.E. (2019). *Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles*. doi: 10.1126/scitranslmed.aav8521.

Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3): 269-288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.

Xie, M., Yu, Y., Kang, R., Zhu, S., Yang, L., Zeng, L., Sun, X., Yang, M., Billiar, T.R., Wang, H., Cao, L., Jiang, J. & Tang, D. (2016). PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nature Communications*, 7(1): 13280. doi: 10.1038/ncomms13280.

Yamashita, A., Zhao, Y., Matsuura, Y., Yamasaki, K., Moriguchi-Goto, S., Sugita, C., Iwakiri, T., Okuyama, N., Koshimoto, C., Kawai, K., Tamaki, N., Zhao, S., Kuge, Y. & Asada, Y. (2014). Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One*, 9(1): e86426. doi: 10.1371/journal.pone.0086426.

Yin, M., Loyer, X. & Boulanger, C.M. (2015). Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 763(Pt A): 90-103. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.06.047.

Yin, Y., Zhou, Z., Liu, W., Chang, Q., Sun, G. & Dai, Y. (2017). Vascular endothelial cells senescence is associated with NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation via reactive oxygen species pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 84: 22. doi: 10.1016/j.biocel.2017.01.001.

Yuasa, T., Amo-Shiinoki, K., Ishikura, S., Takahara, M., Matsuoka, T., Kaneto, H., Kuroda, A., Matsuhisa, M. & Hashida, S. (2016). Sequential cleavage of insulin receptor by calpain 2 and γ -secretase impairs insulin signalling. *Diabetologia*, 59(12): 2711-2721. doi: 10.1007/s00125-016-4102-5.

Zhang, Y., Shi, L., Mei, H., Zhang, J., Zhu, Y., Han, X. & Zhu, D. (2015). Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, 12: 21. doi: 10.1186/s12986-015-0016-3.

Zhao, X., Tan, F., Cao, X., Cao, Z., Li, B., Shen, Z. & Tian, Y. (2020). PKM2-dependent glycolysis promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells during atherosclerosis. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 52(1): 9-17. doi: 10.1093/abbs/gmz135.

Zheng, B., Yin, W., Suzuki, T., Zhang, X., Zhang, Y., Song, L., Jin, L., Zhan, H., Zhang, H., Li, J. & Wen, J. (2017). Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(6): 1279-1294. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.031.

Zheng, Y., Gardner, S.E. & Clarke, M.C.H. (2011). Cell Death, Damage-Associated Molecular Patterns, and Sterile Inflammation in Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12): 2781-2786. doi: 10.1161/atvbaha.111.224907.

Zhou, F., Huang, L., Qu, S., Chao, R., Yang, C., Jiang, Z. & Zhang, C. (2019). The emerging roles of extracellular vesicles in diabetes and diabetic complications. *Clinica Chimica Acta*, 497: 130-136. doi: 10.1016/j.cca.2019.07.032.