

# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

La Empaglifozina, inhibidor del receptor SGLT2 como diana terapéutica en ratas diabéticas Wistar con cardiopatía isquémica, ¿Tratamiento con potencial efecto cardioprotector en isquemia aguda?

**Dña. Elena Saura Guillén**  
2022





**La Empaglifozina, inhibidor del receptor SGLT2 como  
diana terapéutica en ratas diabéticas Wistar con  
cardiopatía isquémica, ¿Tratamiento con potencial  
efecto cardioprotector en isquemia aguda?**

Tesis para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía

Presentada por: Dña. Elena Saura Guillén

Dirigida por:

Dr. D. Antonio Manuel Lax Pérez

Dr. D. Antonio Miguel Hernández Martínez

Tutor: Dr. D. Domingo Pascual Figal

**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Escuela Internacional de Doctorado

Murcia 2022



## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Mi especial agradecimiento a todos los docentes que me han acompañado en este camino: Al Dr. D. Domingo Pascual Figal, por darme la posibilidad de realizar este trabajo; al Dr. D. Antonio Hernández Martínez, por acompañarme en el camino de la formación como Endocrinóloga e Investigación; a la Dra. D.<sup>a</sup> María del Carmen Asensio López, dado que sin su trabajo experimental nada habría sido posible y, por último, a Dr. D. Antonio Lax Pérez, por ayudarme en tan largo y desconocido camino del Doctorado. A todos vosotros, por vuestro tiempo dedicado y conocimientos brindados.

A mis padres, por confiar en mí y mis posibilidades, por los valores y principios inculcados. Por el gran valor que le habéis dado desde mis inicios a la educación y formación. Por la vida y, sobre todo, por enseñarme a vivirla.

A mi hermano, casi mellizo, por estar ahí escuchando y acompañando en todo momento.

A Víctor, amigo y compañero, presente en las alegrías y en las penas, en las risas y en los llantos, en las aventuras y en las largas noches de estudio y trabajo. Por estar siempre ahí.

Por último, pero no menos importante, a toda la familia y todos mis amigos de la vida y de la montaña, de la facultad y residencia.

Gracias.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA.....	5
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	7
ABREVIATURAS .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	17
<b>1.1 Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 2 .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Diabetes y enfermedad cardiovascular .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Miocardiopatía diabética .....</b>	<b>29</b>
1.3.1 Alteraciones en la estructura miocárdica.....	34
1.3.2 Alteración en la homeostasis del calcio .....	36
1.3.3 Sustratos energéticos miocárdicos y resistencia a la insulina.....	37
1.3.4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo .....	41
1.3.5 Disfunción endotelial .....	43
1.3.6 Mecanismos epigenéticos.....	47
<b>1.4 Tratamiento farmacológico de la Diabetes Mellitus .....</b>	<b>48</b>
1.4.1 Ensayos clínicos en Diabetes Mellitus y seguridad cardiovascular .....	49
1.4.2 Fármacos para la DM .....	60
<b>1.5 Modelo experimental con diabetes e infarto de miocardio.....</b>	<b>67</b>
1.5.1 Inducción de diabetes en modelo animal. ....	67
1.5.2 Inducción de infarto de miocardio en modelo animal .....	70
<b>1.6 El papel de la enzima GTP ciclohidrolasa 1 en el remodelado cardíaco. ....</b>	<b>72</b>
2. JUSTIFICACIÓN.....	75
3. HIPÓTESIS.....	79
4. OBJETIVOS .....	83
5. DISEÑO .....	87
<b>5.1 Declaración de aceptación por el comité de Ética. ....</b>	<b>89</b>

5.2	Diseño experimental y protocolo de estudio. ....	89
5.3	Drogas y productos químicos. ....	91
6.	MODELO EXPERIMENTAL .....	93
6.1	Modelo diabético inducido por STZ. ....	95
6.2	Inducción de infarto de miocardio .....	95
7.	RECOGIDA DE DATOS Y VARIABLES .....	97
7.1	Ingesta de alimentos y agua. Recolección de sangre y orina. ....	99
7.2	Ecocardiografía .....	99
7.3	Muestras de tejido e histología.....	100
8.	ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	103
8.1	Ensayos <i>in vitro</i> .....	105
8.2	Ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real.....	106
8.3	Análisis Western Blot.....	107
8.4	Inmunohistoquímica.....	108
8.5	Análisis estadístico. ....	109
9.	PROTOCOLOS EXPERIMENTALES PARA EL ANÁLISIS DE DATOS .....	111
9.1	Aislamiento de células primarias de ratones adultos. ....	113
9.2	Modelo de estiramiento biomecánico. ....	113
9.3	Silenciamiento de GCH1 por ARN de interferencia.....	114
9.4	Tamaño de cardiomiocitos y ensayo de incorporación de [3H] -leucina.....	115
9.5	Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa .....	115
9.6	Fracción proteica. ....	116
9.7	Western blot.....	116

9.8	Protocolo de reevaluación de la transferencia Western.....	118
9.9	Ensayo de actividad de GCH1.....	118
9.10	Inmunofluorescencia cardíaca GCH1.....	119
9.11	Medición de los niveles de BH4.....	120
9.12	Niveles totales de óxido nítrico y superóxido.....	120
9.13	Protocolo de ensayo de 3-nitrotirosina.....	121
10.	RESULTADOS.....	123
10.1	Grupos experimentales.....	125
10.2	Efectos sobre la función cardíaca y el remodelado miocárdico .....	125
10.3	Efectos en la enzima GCH1, niveles de BH4 e isoforma NOS.....	129
10.4	La modulación de la proteína cardíaca GCH1 media los efectos anti-hipertróficos de la empaglifozina.....	133
10.5	Efectos de la Empaglifozina en parámetros metabólicos en ratas Wistar con o sin DM.....	139
11.	DISCUSIÓN.....	141
12.	CONCLUSIONES .....	153
13.	LIMITACIONES.....	157
14.	BIBLIOGRAFÍA .....	161
15.	INDICE DE TABLAS.....	177
16.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	181
17.	ANEXOS .....	203



## ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos.

ACV: Accidente cerebrovascular.

AD: Aurícula derecha.

ADA: Asociación Americana de Diabetes.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AE: Arteriosclerosis.

AGE: Productos de glicosilación avanzada.

AGL: Ácidos grasos libres.

AI: Aurícula izquierda.

ANG II: Angiotensina II.

AP: Atención Primaria.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: Adenosín trifosfato.

BH2: Dihidrobiopterina.

BH4: Tetrahidrobiopterina.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CaMK II: Cinasa II calciomodulina dependiente.

cGCH1: Proteína guanosina trifosfato ciclohidrolasa I cardíaca.

CI: Cardiopatía isquémica.

Col I: Colágeno tipo 1.

Col III: Colágeno tipo 3.

CV: Cardiovascular.

CVOTS: Ensayos clínicos de seguridad cardiovascular.

DAB: Diaminobencidina.

DAG: Diacilglicerol.

DE: Disfunción endotelial.

DLP: Dislipemia.

DM: Diabetes Mellitus.

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1.

DM 2: Diabetes Mellitus tipo 2.

DPBS: Solución salina tamponada con fosfato de dulbecco.

EC: Enfermedad Coronaria.

ECG: Electrocardiograma.

ECV: Enfermedad Cardiovascular.

EMA: Agencia Europea de medicamentos.

EMPA: Empagliflozina.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

EO: Estrés oxidativo.

ERC: Enfermedad renal crónica.

ERK 1/2: Cinasa regulada por señal extracelular.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

EVP: Enfermedad vascular periférica.

FAD: Dinucleótido de flavina y adenina.

FCS: Suero bovino fetal.

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos.

FE: Fracción de eyección.

FID: Federación Internacional de Diabetes.

FRCV: Factores de riesgo cardiovascular.

GBA: Glucemia basal alterada.

GCH1: Guanosina trifosfato ciclohidrolasa I.

GFRP: Proteína reguladora de guanosina trifosfato ciclohidrolasa I.

GIM: Grosor íntima-media.

GSH: Glutación reducido.

GTP: Trifosfato de guanosina.

G3PDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

HBA1C: Hemoglobina glicosilada.

HTA: Hipertensión arterial.

HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.

IC: Insuficiencia cardíaca.

ICFEP: Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada.

ICFER: Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida.

IGF1: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1.

IHC: Intolerancia a los hidratos de carbono.

IM: Infarto de miocardio.

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.

IRS: Proteína del receptor soluble de la insulina.

I-SGLT2: Inhibidor del receptor SGLT-2.

LAD: Ligadura arteria descendente anterior.

LVEDD: Dimensión ventricular izquierda diastólica final.

LVEDV: Volumen ventricular diastólico izquierdo.

LVESD: Dimensión ventricular izquierda sistólica final.

LVESV: Volumen ventricular izquierdo sistólico.

MACE: Evento cardiovascular compuesto por muerte cardiovascular, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

MAPK: Vía de las cinasas activadas por mitógeno.

MCD: Miocardiopatía diabética.

MCP: Miocardiopatía.

MEM: Medio esencial mínimo.

MiARN: Micro ARN no codificantes.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducida.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal.

OH: Radical hidroxilo.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ON: Óxido nítrico.

O<sub>2</sub>: Oxígeno.

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Radical superóxido.

PBS: Tampón fosfato salino.

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa.

PKC: Proteína Cinasa C.

PMSF: Inhibidor de proteasas de serina para lisados celulares fluoruro de fenilmetil-sulforilo.

PPAR  $\alpha$ : Receptor nuclear activado por proliferador de peroxisomas alfa.

PVDF: Membrana de diufloruro de polivinilideno.

RAAS: Eje renina-angiotensina-aldosterona.

R-AGE: Receptor de los productos de glicación avanzada.

RCV: Riesgo cardiovascular.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RI: Resistencia a la insulina.

RyR: Receptores de rianodina.

SEC: Sociedad española de cardiología.

SERCA2a: ATPasa de calcio del retículo endosarcoplasmático 2<sup>a</sup>.

SiGCH1: Proteína guanosina trifosfato ciclohidrolasa I cardíaca silenciada.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

SDS: Sulfato dodecilo sódico.

SGLT2: Inhibidores del cotransportador de sodio glucosa tipo 2.

SHC: Proteína del gen Shc.

SNPS: Sistema nervioso parasimpático.

SNS: Sistema Nacional de Salud.

SNS: Sistema nervioso simpático.

SOD: Superóxido dismutasa.

SOG: Sobrecarga oral de glucosa.

STZ: Streptozotocina.

TBST: Solución salina tamponada con tris.

TnT: Troponina T cardíaca.

VD: Ventrículo derecho.

VI: Ventrículo izquierdo.

3-NT: 3 Nitrotirosina.

$\beta$ -MHC: Cadena pesada de miosina  $\beta$  cardíaca.



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 2

En las últimas décadas, la prevalencia de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y sus complicaciones se han visto incrementadas de forma global a pesar del desarrollo de nuevos fármacos anti-hiperglucemiantes. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tasa mundial de adultos con Diabetes Mellitus (DM) es superior a 425 millones, habiéndose producido un incremento global en la prevalencia del 4.7% en 1980 al 8.5% en 2014 (1).

La Federación Internacional de Diabetes (FID) estima que 1 de cada 11 adultos con edades comprendidas entre los 20-79 años padece DM2 (2), lo que la convierte en uno de los problemas sanitarios más importantes en los últimos años, tanto por la prevalencia y coste sanitario de la enfermedad en sí, como por sus complicaciones, y muertes prematuras que provoca (3).

La elevación persistente y mantenida de la glucemia produce lesiones en múltiples tejidos, siendo los más vulnerables los vasos de la retina, riñones y nervios periféricos, lo que se conoce como microangiopatía diabética. A su vez, produce un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) por afectación macrovascular o macroangiopatía diabética, caracterizada por afectación cerebrovascular, enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica (EVP). La ECV puede aparecer de forma aislada o asociada a otros factores de riesgo cardiovascular (FRCV), muy prevalentes en este tipo de pacientes (4), como hipertensión arterial (HTA), dislipemia (DLP) y obesidad, entre otros. La presencia en un mismo paciente de DM2 y ECV incrementa el riesgo de muerte, siendo la ECV la principal causa de morbimortalidad en este colectivo (5). De tal forma que el riesgo de ECV en las personas con DM2 es

entre 2 y 8 veces superior al de la población general, siendo ésta la causa de muerte en un 50-80% de los casos (6).

Estas complicaciones cardiovasculares (CV) pueden estar presentes previo al diagnóstico de DM, en prediabetes, suponiendo ya una disminución de la esperanza de vida, discapacidad y altos costes económicos.

Se sabe que, la DM acelera por sí misma el proceso de arteriosclerosis (AE). Para su caracterización, se ha descrito la presencia de AE en DM comparándola con sujetos control de similar edad y sexo no DM, evidenciándose que en pacientes con DM evolucionada, sin complicaciones asociadas ni otros FRCV, existe un valor del grosor íntima-media (GIM) carotídeo correspondiente al de sujetos 10 años mayores, presencia un 18% superior de placa de ateroma carotídea y un aumento en la rigidez arterial, todos ellos parámetros predictores de ECV (5).

En varones la prevalencia de ECV es superior a la de las mujeres, pero esta diferencia entre sexos desaparece cuando hablamos de personas con DM. El riesgo de ECV en DM es mayor en el sexo femenino comparando ambos sexos con su población de referencia sin DM (5).

En los países desarrollados, la DM está entre la cuarta y octava causa de muerte, siendo en España la tercera causa en mujeres y la séptima en varones. En Europa, las tasas de defunción rondan las 7,9 defunciones por 100.000 personas/año (3). Las causas de mortalidad son la ECV, en el 70% de los casos, seguida de la propia DM, cáncer y neumonía.

En España, según el estudio Di@betes (principal estudio epidemiológico poblacional de DM realizado en nuestro país), la prevalencia en población adulta de DM2 es del 13.8%, un 14.8% presenta prediabetes o alteración del

metabolismo de la glucosa (caracterizado por glucemia basal alterada (GBA) o intolerancia a los hidratos de carbono (IHC)) y del 6% de DM ignorada o no diagnosticada (7).

Se estima que en los próximos años la prevalencia de DM2 presentará cifras epidémicas en todo el mundo (6,8), incrementándose del 8% al 10% (9), lo que ascendería a más de 640 millones de diabéticos en el mundo (2).

La prevalencia de la DM2 es variable en las distintas poblaciones, tanto en un mismo país como a nivel mundial, siendo diferentes las causas que lo justifican (10), como el grado de urbanización y desarrollo de la población, la longevidad, dieta, ejercicio, la nutrición en el ambiente fetal-neonatal, factores raciales y antecedentes familiares, entre otros (3,11).

Es de especial mención el aumento en el número de los diagnósticos de prediabetes y DM2 a edades más precoces, en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Se estima que ha habido un incremento del 31% en la prevalencia de DM2 en el intervalo de edad comprendido entre 10 y 19 años (9), y del 87.1% en el diagnóstico de IHC mediante sobrecarga oral de glucosa (SOG), aumentando del 7% al 13.1 % (8). Asimismo, ha aumentado el número de pacientes jóvenes con diagnóstico de enfermedades consideradas de alto riesgo cardiovascular (RCV) y, por tanto, mayor riesgo de complicaciones a edades más precoces (12).

El incremento de la DM2 en España y Europa (13) se puede justificar por varios factores. En primer lugar, el cambio en los criterios diagnósticos de DM2 en 1999 por la OMS. Se decide bajar el punto de corte del valor de GBA para el diagnóstico de superior o igual a 140 mg/dl en dos determinaciones, a ser diagnóstica con dos determinaciones superiores o iguales a 126 mg/dl, manteniendo el criterio diagnóstico tras SOG >200 mg/dl inalterado (6). En

segundo lugar, el envejecimiento de la población por un aumento de la esperanza de vida y descenso de la natalidad, por lo que, siendo la edad uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DM2, se justifica en parte este incremento. También hay que destacar la disminución de la mortalidad en los pacientes con DM, gracias a terapias intensivas tanto para la enfermedad en sí, como para los FRCV y complicaciones asociadas a ésta, lo que justifica un aumento en la esperanza de vida y del número total de pacientes diabéticos, aunque la esperanza de vida global de estos pacientes esté disminuida respecto a los no diabéticos a igualdad de edad y sexo (1). En España existe una tendencia descendente en las tasas de defunción, aunque en números absolutos las defunciones hayan aumentado de forma global (3). En el estudio Framingham se mostró una reducción en los eventos CV en DM del 50% en el período de tiempo comprendido en los años 1977-1995, respecto a 1950-1966 (14). Por último, otras causas que justifiquen este aumento de prevalencia son las cifras de sobrepeso y obesidad en la población (2), siendo el exceso de peso junto a la edad avanzada, los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (11).

En cuanto a los costes, se calcula que el consumo por la DM supone un 4-14% del gasto sanitario total en países occidentales, siendo el consumo de recursos de un diabético entre 2 y 6 veces superior respecto al paciente con enfermedad crónica, sin DM a igualdad de edad y sexo (3).

El estudio SECCAID (15) (Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes), cuyo objetivo fue estudiar los costes directos de la DM y sus complicaciones en España, mostró que, los gastos hospitalarios supusieron un total de 1.934 millones de euros (33% sobre el coste total), siendo las

complicaciones crónicas y los costes de las altas no relacionadas directamente con la DM, los principales motivos de este gasto, con 924 millones de euros (16% sobre total DM) y 568 millones (10% sobre total DM) respectivamente. El tratamiento de las complicaciones agudas y crónicas supuso 995 millones de euros (17% sobre total), siendo el mayor gasto asociado a la ECV (521 millones de euros) y la EVP (127 millones de euros), un 52% y 13% respectivamente del total de este coste. El gasto farmacológico supuso un total 2.232 millones de euros (38% sobre total DM). En cuanto al gasto por la atención médica, el generado en Atención Primaria (AP) ascendió a 1.643 millones de euros (28% total DM), suponiendo el mayor coste el generado por las visitas al médico de AP (618 millones de euros; 11% sobre total DM), comparado con las visitas al especialista (unos 418 millones de euros; 7% sobre total DM) (Figura 1).

Por tanto, los recursos económicos de la DM para el Sistema Nacional de Salud (SNS) ascendieron a 5.809 millones de euros, equivalente al 8,2% del gasto sanitario total. Si tuviéramos en cuenta el infra diagnóstico de la DM, el coste de la DM podría ascender a 8.787 millones de euros (12,5% del gasto sanitario) (Figura 2).

La detección precoz de la prediabetes y DM puede beneficiar la implementación de medidas terapéuticas precoces, evitar la progresión y complicaciones (7), junto a una mejora en el control de la glucemia (5).

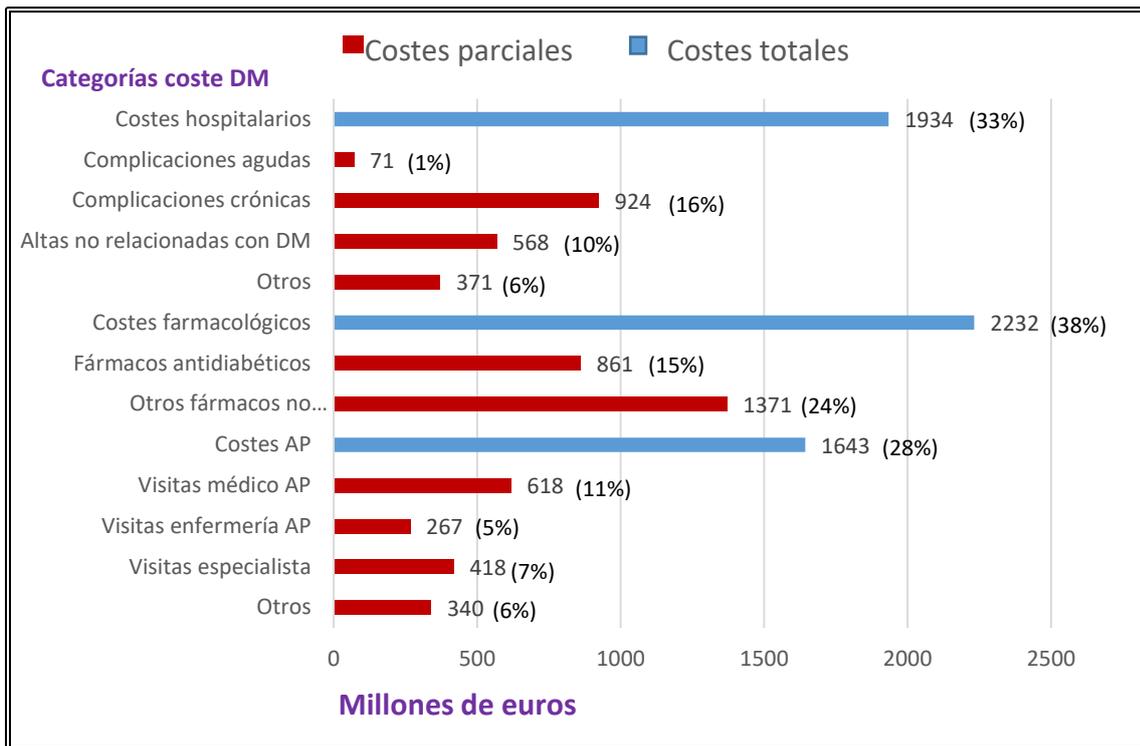


Figura 2. Costes directos relacionados con la diabetes mellitus y sus complicaciones (% sobre el total). Estudio SECCAID. C Crespo y col.

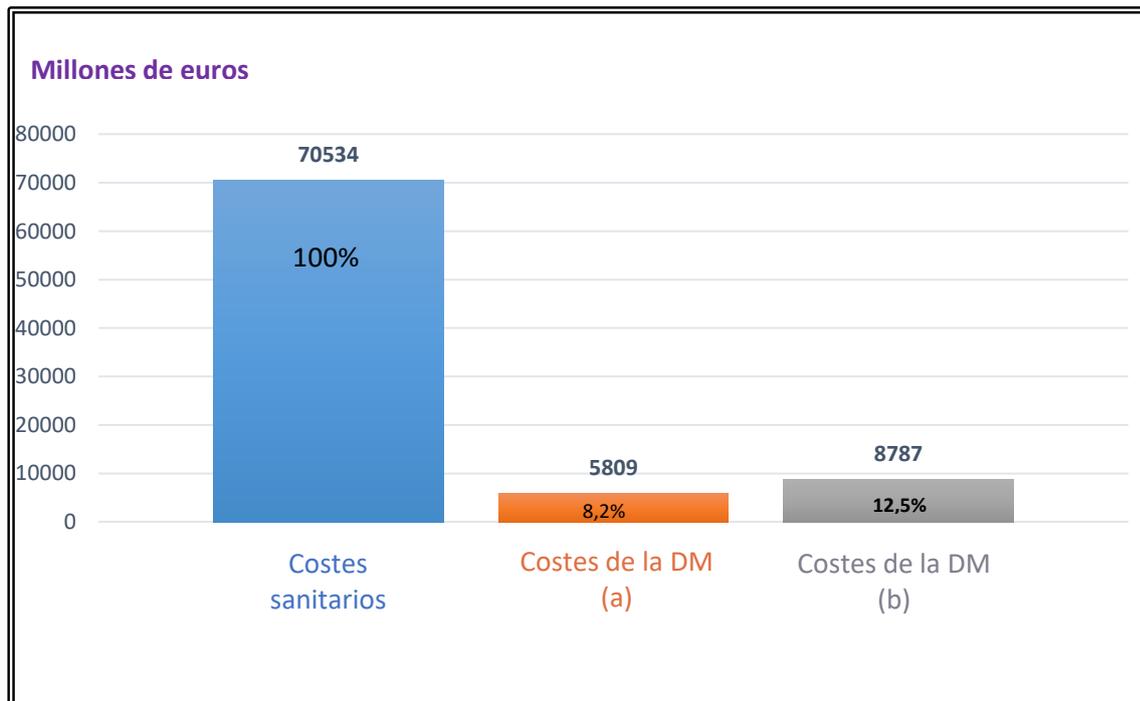


Figura 1. Impacto de la DM en el gasto sanitario global español. Millones de euros (% sobre el total). DM: diabetes mellitus. a) Considerando prevalencia diagnosticada DM2 7,8%, 90% de la prevalencia total diagnosticada de DM. b) Considerando prevalencia. Estudio SECCAID. C Crespo y col.

## 1.2 Diabetes y enfermedad cardiovascular

La enfermedad arteriosclerótica es la responsable de la elevada morbimortalidad en la DM. Un 80% de los DM morirán por esta causa y hasta en un 75% de las hospitalizaciones por DM2 el motivo estará relacionado con las complicaciones CV (16).

La relación entre la DM y la ECV ha generado gran controversia en las últimas décadas con respecto a su equivalente de RCV. A partir de los resultados evidenciados por Haffner, que mostró que las personas con DM sin infarto de miocardio (IM) previo tenían un riesgo similar de cardiopatía coronaria que las personas sin DM con IM (17), el National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) propuso a la DM como un equivalente de riesgo coronario (16); pero Bulugahapitiya, en un metaanálisis posterior, no apoyó esta hipótesis, evidenciando que la DM por sí sola no es un equivalente de cardiopatía coronaria, por lo que en la práctica clínica habitual, debemos establecer el RCV individual en función de escalas de riesgo y FRCV (18). El tratamiento de los FRCV es un pilar fundamental para el control de ECV, pero los factores de riesgo tradicionales por sí mismos no explican el incremento de riesgo vascular en la DM2.

La insuficiencia cardíaca (IC) y la DM2 son dos enfermedades crónicas que pueden presentarse de forma simultánea en un mismo paciente incluso en el momento del diagnóstico o durante su evolución clínica. El riesgo de padecer DM2 o IC aumenta de forma directamente proporcional con la edad y, el padecer una de estas patologías, DM2 o IC, aumenta a su vez la probabilidad de padecer la otra entidad.

El estudio Framingham plasmó esta conexión entre la DM y la IC, mostrando que la DM predispone a IC, multiplicando el riesgo de aparición de ésta entre 2 y 8 veces (19). El riesgo de IC está relacionado con las cifras de glucemia y con la resistencia a la insulina (RI), aumentando el desarrollo de IC un 8% por cada 1% de deterioro en cifras de hemoglobina glicosilada (HbA1c), independientemente de las comorbilidades asociadas. Se ha mostrado que el descenso de 1% en la HbA1c se asocia con una disminución del riesgo de IC del 16% (20). Sin embargo, no se ha demostrado de manera fehaciente que la disminución de los niveles de glucemia reduzca las tasas de episodios CV y muerte (21), aunque es de esperar un descenso en la incidencia de éstos con la mejora del control glucémico a largo plazo (22).

Respecto a la estimación del RCV, autores españoles han estudiado el riesgo de episodios coronarios (EC) mediante diferentes sistemas de estimación y poder así predecir la aparición de las complicaciones. Con el estimador de riesgo Framingham-REGICOR (23,24), la probabilidad de EC a 10 años fue de entre el 5,6 y el 15% en los varones, y de entre el 6 y el 10% en las mujeres. Con el UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study, estudio prospectivo sobre diabetes realizado en Reino Unido), estimador específico para la DM, en varones había un riesgo de EC a 10 años de entre el 19 y el 38%, mientras que oscilaba entre el 11 y el 28% en las mujeres (25). Por último, al utilizar el SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation, índice de valoración de riesgo cardiovascular global) para predecir el riesgo de mortalidad por EC a 10 años, se evidenció que en las mujeres era de un 2%, en comparación con el 4% en los varones (26). Por tanto, para la prevención de las complicaciones vasculares, es

esencial el control de la glucemia y el diagnóstico y tratamiento de las comorbilidades, especialmente los FRCV en los pacientes con ECV establecida.

Una causa del mal pronóstico en la DM, con o sin cardiopatía isquémica (CI), es la mayor prevalencia de disfunción ventricular e IC (27). En este sentido, la prevalencia de la IC en DM2 es del 12%, variando las cifras en función no sólo del estudio analizado, sino también de la edad y sexo, oscilando entre un 10 y 30%, siendo más frecuente a mayor edad y en el sexo femenino (28). Por el contrario, la prevalencia de DM2 en pacientes con IC alcanza el 30%, independientemente del tipo de IC, insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada (ICFEp) o reducida (ICFEr). Este porcentaje se incrementa al 40% en pacientes hospitalizados por IC (28). La incidencia de debut de DM2 en pacientes con IC también es superior, con una disminución del riesgo con el tratamiento convencional de la IC. A su vez, la coexistencia de DM2 en la IC se ha relacionado con un empeoramiento de la clase funcional NYHA (Clasificación funcional de la New York Heart Association), independientemente de la fracción de eyección (FE) (29,30).

El IM en la población diabética es la complicación CV más frecuente (31) y supone una mortalidad 2-3 veces superior respecto a los no DM, debido a una elevada mortalidad intrahospitalaria por IC izquierda, shock cardiogénico y alteraciones de la conducción (32), lo que convierte a la DM como factor de riesgo independiente para la aparición de disfunción ventricular, probablemente a través de la presencia de la miocardiopatía (MCP) específica de la diabetes (33,34). La disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (VI) también puede ser una característica precoz de la disfunción miocárdica diabética (33). Se estima que entre el 16 y el 75% de las personas con DM2 tienen disfunción diastólica o

sistólica, o ambas. La evolución desde la disfunción miocárdica subclínica a la IC clínica evoluciona en años, y se ha sugerido que esta disfunción miocárdica subyacente puede explicar, al menos en parte, el peor pronóstico de la ECV en DM2. Aunque la disfunción miocárdica puede aparecer en sujetos sanos con DM2, con frecuencia coexiste con comorbilidades, como miocardiopatía diabética (MCD), EC, HTA, obesidad, DLP, disfunción plaquetaria y neuropatía autonómica cardíaca, determinando el pronóstico.

La disfunción endotelial (DE) aparece precozmente en la evolución natural de la DM, existiendo evidencia de la presencia de marcadores de DE elevados años antes de su manifestación clínica (35). Con lo comentado hasta ahora, podemos concluir que, el hecho de padecer DM, aumenta el riesgo de ECV, daño endotelial y MCD, pero más aún cuando se añaden FRCV, principalmente la HTA, cuya prevalencia en DM se duplica respecto a los no diabéticos y, si está fuera de objetivo de control, duplica a su vez el riesgo de EC y acelera la progresión de enfermedad renal crónica (ERC), marcador de riesgo de ECV e IC (36–38).

Por último, el accidente cerebrovascular (ACV), con una incidencia de entre 2.5-3.5 veces mayor en DM respecto a no DM, es consecuencia de la afectación de la arteria carótida y/o de los vasos intracraneales, siendo la DM factor de riesgo independiente para su desarrollo, con un riesgo incrementado de 1.37 por cada 1% de empeoramiento de HbA1c, siendo ésta la segunda causa de muerte en DM tras la afectación miocárdica (31).

Pese a los avances tanto en el tratamiento de la ECV como en la DM, la mortalidad de los pacientes diabéticos no se ha reducido respecto a los no

diabéticos. Los pacientes DM2 que desarrollan IC tienen entre 10 y 12 veces más riesgo de muerte que aquellos que no desarrollan la IC (29).

Sabiendo que en pacientes con IC, la DM2 se asocia de forma independiente con un aumento del riesgo de muerte por cualquier causa (HR 1.28) y muerte de causa CV (HR 1.34) y de hospitalización (HR 1.41) (29), los nuevos fármacos para la DM2, los inhibidores del receptor SGLT2 (i-SGLT2), abren una nueva puerta para el manejo de la enfermedad, dado su alentador beneficio en cuanto a disminución del RCV e IC. Es por ello que surge el interés en conocer cuáles son los posibles mecanismos asociados a la disminución del RCV en el paciente tratado con esta nueva diana terapéutica.

### **1.3 Miocardiopatía diabética**

La IC acontece aproximadamente en 1 de cada 5 pacientes diabéticos entorno a los 65 años. Ambas patologías conllevan un peor pronóstico, con una mediana de supervivencia de unos 4 años. Existen una gran cantidad de estudios epidemiológicos que evalúan la relación entre la IC y la DM. El Framingham Heart Study muestra esta relación, siendo la IC entre dos y cinco veces más frecuente en varones y mujeres con DM, respectivamente, frente a no diabéticos. En cuanto a población con IC, existe una prevalencia de DM superior al 44%, frente a la prevalencia de DM en población general sin IC del 10% aproximadamente (39).

No se ha demostrado que el descenso glucémico por sí mismo sea capaz de disminuir los ingresos por IC y, hasta ahora, ningún fármaco anti hiperglucemiante había demostrado disminuir el número de ingresos por esta causa. Sin embargo, los i-SGLT2 han demostrado un descenso en la tasa de

ingresos hospitalarios por IC, por un mecanismo no demostrado hasta este momento, pero clínicamente relevante (40).

Desde hace años se conoce la relación entre la DM y la IC, siendo descrita por primera vez en 1881 por Leyden. Posteriormente, en 1954, Lundbaek fue el primero en describir específicamente la MCD como entidad clínica frecuente en ancianos diabéticos (41). Rubler, en 1972 (42), demostró, en estudios post mortem, la asociación de la MCD con la DM en pacientes diabéticos sin EC, con IC e ICFER, en presencia de complicaciones microvasculares (43).

Desde los inicios del conocimiento de esta entidad hasta la actualidad se han sucedido diferentes definiciones de MCD, sin tener aún una definición universalmente aceptada para su descripción. La mayoría se fundamentan en criterios clínicos, siendo requisito para el diagnóstico la ausencia de otras enfermedades, tales como EC o HTA, siendo ambas altamente prevalentes en el paciente diabético. Otras, en cambio, se basan en criterios fisiopatológicos, como fibrosis intersticial o hipertrofia ventricular (44). En el año 2018, la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) afirma que “no hay definición de miocardiopatía diabética”, plasmando como definición más extendida la “disfunción miocárdica que ocurre en ausencia de otras enfermedades cardiovasculares” (29). Siendo esto poco realista y dada la alta prevalencia de ECV en la DM, muchos autores la definen como “aquellas alteraciones cardíacas que no se explican por otras enfermedades cardiovasculares y que pueden ser atribuidas a la diabetes” (45). Esta falta de consenso hace difícil conocer la verdadera prevalencia de la enfermedad.

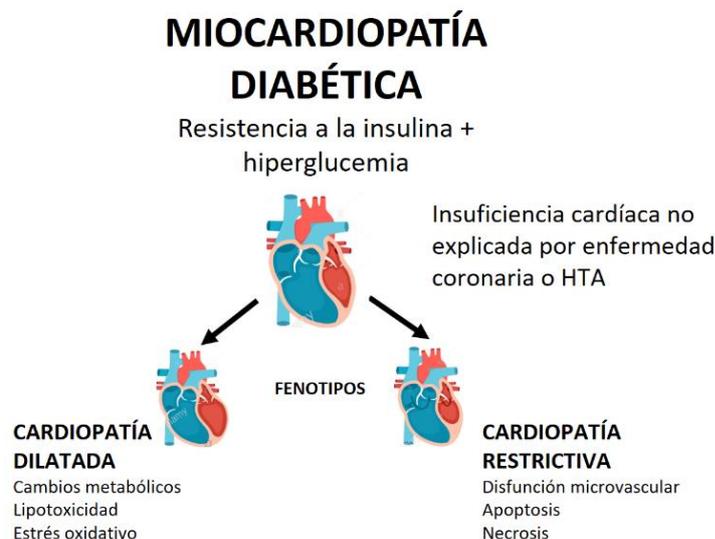
En cuanto a la fisiopatología, existe una relación estrecha entre la IC y la DM, influyendo deletéramente ambas entre sí (44). Pese a que la etiología de la

DM Tipo 1 (DM1) y DM2 difieren por completo, se caracterizan por hiperglucemia, ya sea por ausencia de insulina en la DM1 o por resistencia a ésta en DM2 (46), contribuyendo a la disfunción miocárdica. La DM causa un aumento absoluto o relativo en la masa y espesor del VI, independientemente de la obesidad o patologías asociadas. Inicialmente existe un período subclínico con modificaciones estructurales y funcionales que conllevan fibrosis y disminución en la relajación del VI, permaneciendo la mayoría de pacientes asintomáticos en fases precoces y, progresivamente, se manifiesta la clínica de IC (47).

Inicialmente, la MCD se describió con fenotipo de ICFER pero, cada vez más autores, como Seferovic, describen la presencia de 2 fenotipos independientes, la ICFEP e ICFER, que surgen como resultado de diferentes mecanismos responsables del remodelado cardíaco, restrictivo y dilatado. No obstante, se desconoce qué factores determinan cada uno de los tipos (44), siendo a nivel estructural, completamente distintos. En ambos fenotipos va a tener lugar la afectación de la microvasculatura coronaria, aumento de radicales libres, inflamación y la fibrosis.

En el fenotipo restrictivo/ICFEP el VI está hipertrofiado y rígido. Presenta cardiomiocitos hipertrofiados, con un aumento del depósito de colágeno, que produce fibrosis reactiva y elevada tensión de reposo, pero con estructura sarcomérica normal, siendo característica la DE en la microvasculatura coronaria. La DE será la causante del aumento de la rigidez del cardiomiocito y de la reducción de la distensibilidad por su papel en el remodelado cardiaco y por la disminución de la disponibilidad del óxido nítrico (ON).

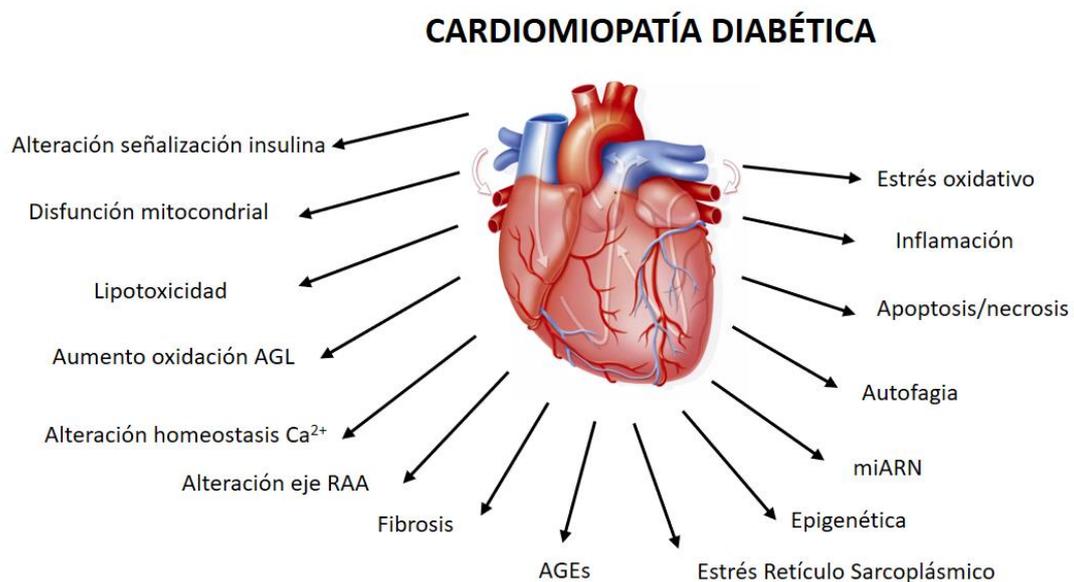
Sin embargo, el fenotipo dilatado/ICFER se caracteriza por la pérdida de cardiomiocitos por isquemia o toxicidad, produciéndose estrés oxidativo (EO) por hipoxia tisular. En este fenotipo encontramos un VI dilatado, con áreas con pérdida de cardiomiocitos, alteración en su estructura sarcomérica y fibrosis de reemplazo, depósito de colágeno entre los cardiomiocitos (44).



*Figura 3. Mecanismos de remodelado cardiaco en los fenotipos restrictivo y dilatado de la MCD. Adaptado de Saldarriaga-Giraldo y Col.*

Con lo comentado hasta ahora, se evidencia que existen múltiples mecanismos que van a ser determinantes en esta disfunción miocárdica y endotelial, aunque la patogenia no está claramente definida. Durante las

primeras etapas de la DM, se produce un cambio metabólico en la oxidación de los sustratos energéticos, que finalmente es ineficiente, produciendo glucoxicidad celular, lipotoxicidad celular y disfunción mitocondrial, con un aumento de los radicales libres, EO, inflamación y una respuesta que induce el remodelado cardíaco y fibrosis. Dada la complejidad de la fisiopatología y las diferentes vías implicadas en el desarrollo de la MCD, vamos a describir los mecanismos más relevantes en esta entidad.



*Figura 4. Representación esquemática de los múltiples mecanismos potenciales que han sido implicados en la fisiopatología de la miocardiopatía diabética. AGL: ácidos grasos libres. RAA: Renina-Angiotensina-Aldosterona. AGEs: Productos finales de glicación avanzada. miARN: micro ARN no codificantes. Adaptado de Bugger H y Col.*

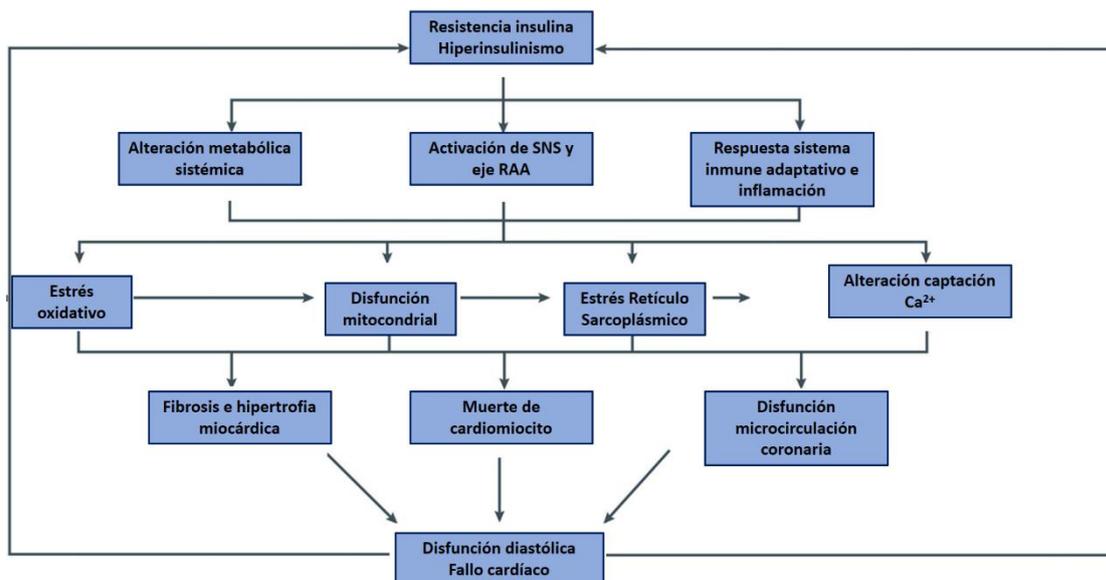


Figura 5. Desarrollo y progresión de la miocardiopatía diabética. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia aumentan los trastornos metabólicos sistémicos, activan el SNS (Sistema Nervioso Simpático), el eje Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA), lo que genera estrés oxidativo inmediato, disfunción mitocondrial, estrés del retículo sarcoplásmico y alteración de la homeostasis del calcio. Estos efectos resultan en fibrosis cardíaca, hipertrofia, muerte de cardiomiocitos, disfunción de la microcirculación coronaria y eventualmente insuficiencia cardíaca. Además, estos cambios fisiopatológicos en los cardiomiocitos subyacen a los factores de riesgo de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, lo que puede resultar en un círculo vicioso. Adaptado de Hu X y Col.

### 1.3.1 Alteraciones en la estructura miocárdica

La DM causa cambios estructurales como fibrosis e hipertrofia miocárdica. Estos procesos inicialmente son mecanismos adaptativos, manteniéndose los pacientes asintomáticos, pero progresivamente evoluciona a disfunción miocárdica, pudiendo aparecer entonces los síntomas clínicos de IC. Algunos autores consideran que un control metabólico estricto es beneficioso para evitar la disfunción miocárdica pero, a medida que evoluciona la enfermedad, estas alteraciones parecen ser irreversibles, no considerándose por ello el control glucémico un factor determinante para reducir el RCV en la MCD (48).

La fibrosis cardíaca es un hallazgo característico en el corazón diabético. La presencia de fibrosis en muestras de miocardio humano está ampliamente

aceptado, apareciendo tanto a nivel de ventrículo derecho (VD) como VI, e implica la acumulación de colágeno tipo I (Col. I) y tipo III (Col. III), por diferenciación de los fibroblastos para aumentar su síntesis (47,49). La detección precoz de fibrosis cardíaca es fundamental para poder realizar una intervención terapéutica eficaz. La hipertrofia inducida por la DM produce un aumento en la masa ventricular, grosor de la pared del ventrículo y rigidez diastólica. Comparando pacientes no diabéticos con hipertrofia de VI (HVI), respecto a pacientes diabéticos con HVI, éstos últimos presentan una disfunción diastólica ventricular más grave que los no DM (48).

El aumento en la rigidez del cardiomiocito es, en parte, debido también a una señalización anormal de la insulina, con una disminución de la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática, lo que conlleva una disminución de captación de glucosa, disminución de la actividad de la bomba  $Ca^{2+}$  y de la entrada de  $Ca^{2+}$  al retículo sarcoplásmico, aumentando éste a nivel intracelular (44) y una disminución en la síntesis de ON a través de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) estimulada por insulina. Estas alteraciones producen el aumento de la rigidez miocárdica y alteración de la relajación, ambas manifestaciones cardinales en la MCD (50). La hiperglucemia, RI y EO pueden producir hipertrofia del cardiomiocito por incremento en la expresión de genes, como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y por estímulo de otras vías de señalización como la quinasa regulada por señal extracelular (Erk1/2) y la del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (50,51).

### 1.3.2 Alteración en la homeostasis del calcio

Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico regulan el metabolismo celular, la contracción muscular y la señalización celular. En el acoplamiento excitación-contracción cardíaca, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra al citoplasma a través de los canales L- $\text{Ca}^{2+}$  tras la despolarización del sarcolema, lo que desencadena la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, mediado por los receptores de rianodina (RyR), altamente susceptibles al EO (47).

Durante la relajación cardíaca, el  $\text{Ca}^{2+}$  vuelve al retículo sarcoplásmico y el resto de  $\text{Ca}^{2+}$  es bombeado por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  del sarcolema al exterior celular (49). Sin embargo, en la MCD hay una disfunción en los transportadores, por lo que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  está alterada, produciéndose un aumento en el potencial de acción, que prolonga el tiempo de relajación diastólica (50).

Tanto en DM como en IC existe una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, disfunción contráctil y reducción de actividad de los complejos actina-miosina-troponina por una sobreexpresión de la quinasa II calcio-modulina dependiente (CaMKII) (49).

La alteración en las señales metabólicas de la insulina produce una disminución en la síntesis del ON por la eNOS y como consecuencia, una menor captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico y un aumento a nivel citoplasmático, lo que contribuye en la disminución de la relajación miocárdica y aumento en la rigidez (47).

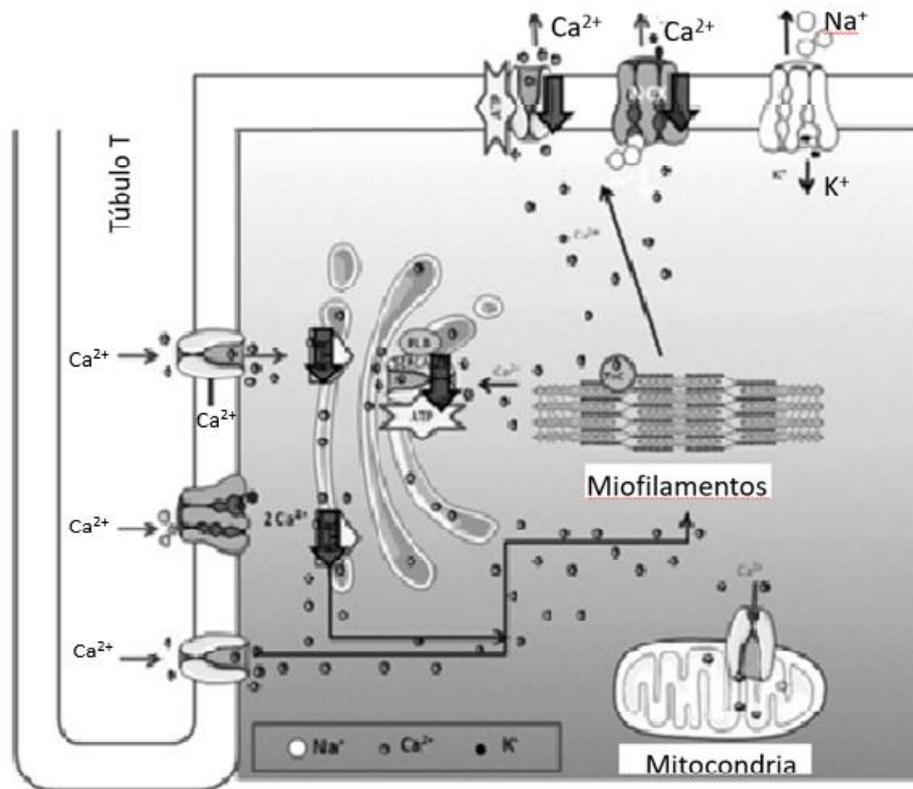


Figura 6. Flujo del  $\text{Ca}^{2+}$  en el cardiomiocito. Captación en el Túbulo-T, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra al citoplasma a través de los canales L- $\text{Ca}^{2+}$  tras la despolarización del sarcolema, lo que desencadena la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, mediado por los receptores de rianodina. Difusión a través del espacio citosólico para alcanzar las proteínas contráctiles. Al unirse a la troponina C, se desencadena el deslizamiento de filamentos delgados y gruesos y la contracción miocárdica.  $\text{Ca}^{2+}$  regresa a los niveles diastólicos por la activación de la bomba SERCA2a. La flecha negra indica la regulación descendente de transportadores/intercambiadores específicos en la miocardiopatía diabética. Figura obtenida y adaptada de Falcao-Pires y Col.

### 1.3.3 Sustratos energéticos miocárdicos y resistencia a la insulina

Las vías de señalización de insulina a nivel miocárdico median la homeostasis celular a través del control de la síntesis proteica, utilización de sustrato y supervivencia celular (49). El transporte y captación de glucosa en el tejido cardíaco está mediado principalmente por GLUT4.

La insulina se une a su receptor y éste recluta y fosforila principalmente dos proteínas adaptadoras: proteína del receptor soluble de la insulina (IRS) y la

proteína del gen SHC (Shc), ambas implicadas en activar cascadas de señalización intracelular (52). Una de las vías mediadas por IRS es la del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K/Akt), relacionada con la activación y la regulación de procesos metabólicos como el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos. En las vías mediadas por Shc, la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK), regula funciones proliferativas y de crecimiento celular.

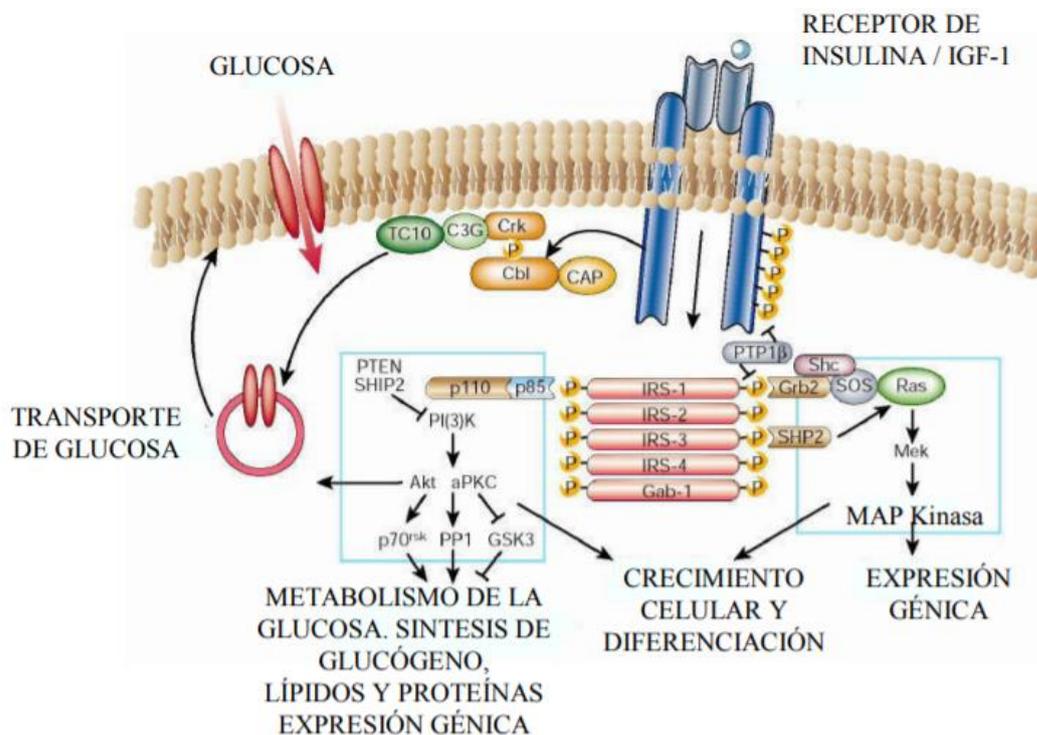


Figura 7. Vías de señalización de la insulina. Adaptado de Saltiel y Col.

Al activarse IRS-PI3K/Akt, se estimula la translocación de GLUT4 a la membrana celular, produciéndose un aumento en la captación de glucosa. Además, la señalización de la insulina promueve la activación de eNOS y ON necesario para proporcionar un flujo vascular y poder mantener una función miocárdica óptima (50).

La reducción del receptor de insulina IRS-1/2 disminuye la producción de adenosín trifosfato (ATP) en el cardiomiocito, produciendo un deterioro en el metabolismo cardíaco, causando fibrosis e IC. La disminución en la señalización PI3K/Akt y de la expresión y translocación de GLUT4 en el músculo ventricular de pacientes DM2 se ha descrito en biopsias de estudios post mortem (50).

La RI produce un incremento de la lipólisis, lipogénesis y gluconeogénesis hepática con el objetivo de aportar combustible al cardiomiocito pero, al presentar éste RI, la disminución de la actividad IRS-PI3K/Akt lleva a una disminución de la oxidación de sustrato energético y lipo/glucotoxicidad, así como a la disminución de la disponibilidad del ON y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (44).

Como consecuencia, deterioro de la función contráctil, incremento del EO, inflamación, fibrosis e hipertrofia miocárdica, deterioro de la contractilidad y desarrollo de eventos isquémicos e IC (53,54).

En situación de hipoxia, como puede ser en el contexto de la isquemia cardíaca, aumenta la translocación de transportadores de glucosa miocárdicos que, junto al aumento de la actividad AMPK, incrementan la captación y utilización de glucosa como fuel energético (55).

La glucosa es el principal sustrato metabólico en situación de hipoxia tisular, debido a que la producción de ATP, mediante la conversión de glucosa a lactato, es independiente de la presencia de oxígeno (O<sub>2</sub>), similar a lo que ocurre en situaciones de isquemia miocárdica. En el miocardio sano el cambio metabólico de oxidación de grasa a glucosa se produce rápidamente para responder a las demandas energéticas (ejercicio, isquemia...), pero no ocurre así en el contexto de la MCD (56), en la que encontramos una alteración de los

mecanismos compensadores, con un empeoramiento de la disfunción miocárdica tras estos eventos de aumento de las demandas energéticas, por no poder realizar este “switch metabólico” de forma eficiente (54,55).

El miocardio sano oxida en un 70% AGL y en un 30% glucosa pero es metabólicamente muy flexible, pudiendo adaptarse a la disponibilidad de los diferentes sustratos y utilizar como fuel energético lactato, piruvato, glicerol o  $\beta$ -hidroxibutirato durante periodos de ayuno (50).

Una de las vías metabólicas que lo permiten es el ciclo de Randle, siendo el factor determinante para la utilización de un sustrato en el corazón la disponibilidad de glucosa: niveles elevados en sangre disminuyen la tasa de oxidación de AGL y viceversa (44). En la IC está deteriorado el procesamiento de la energía a nivel mitocondrial y, pese a disponer de cifras elevadas de AGL y glucosa, éstos no pueden ser metabolizados, se acumulan en el citosol y producen gluco y lipotoxicidad, metabolitos intermedios y alteración en las vías de señalización (34).

En situación de hiperglucemia, RI e hipertrigliceridemia, hay una disminución de oxidación de glucosa por disminución del GLUT4, produciéndose un cambio hacia la oxidación de AGL (50) por un aumento en la expresión del receptor CD36 y alteración señalización PI3K/Akt (51), lo que conlleva pérdida de la flexibilidad metabólica, oxidación deletérea y lipotoxicidad (43). Secundariamente, una disminución de expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y sobre todo GLUT4, con un aumento en la expresión del receptor nuclear activado por proliferador de peroxisomas alfa (PPAR- $\alpha$ ), que incrementa la RI, mayor utilización de AGL frente a la glucosa, favoreciendo el

desacoplamiento mitocondrial e incrementando los requerimientos de O<sub>2</sub> por cada molécula de ATP generada (44,49).

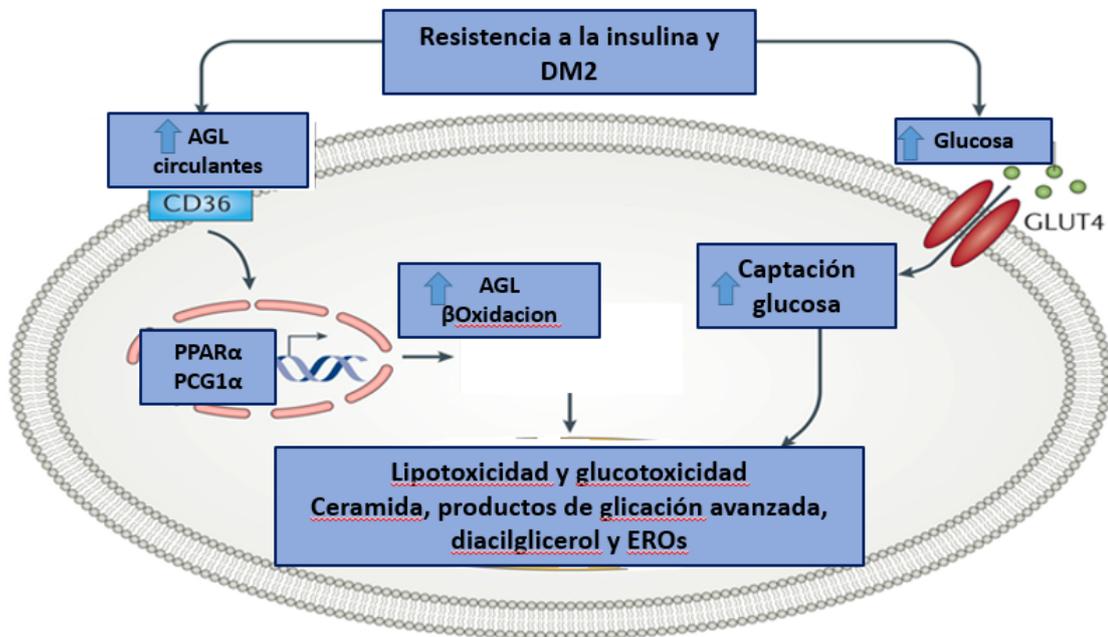


Figura 8. La RI y la DM2 conllevan una función metabólica deletérea en el cardiomiocito. En DM2, la expresión de PPARα y PGC-1α cardíacos aumenta, lo que mejora la transcripción de proteínas que controlan la absorción y oxidación de ácidos grasos libres, por aumento del CD36. La glucosa es un sustrato más eficiente que los ácidos grasos libres, pero en este contexto se produce un cambio metabólico cardíaco de glucosa a ácidos grasos, lo que disminuye la eficiencia cardíaca. PPARα: receptor activador por proliferador de peroxisomas-α; PGC-1α, coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas; ROS, especies reactivas de oxígeno. Imagen obtenida de Jia G y Col.

### 1.3.4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

La disfunción mitocondrial es base en el desarrollo del EO y se considera epicentro de la CMD (57).

El término EROs incluye tanto a los radicales libres como el radical hidroxilo (OH), el radical superóxido (O<sup>2-</sup>) o como al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La síntesis de EROs ocurre de forma fisiológica, siendo el desequilibrio entre formación y destrucción el causante del EO.

Los mecanismos por los que se va a producir el aumento de EROs son múltiples, entre ellos, el desacoplamiento en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, aumento en la función y expresión de diferentes vías enzimáticas (Proteína cinasa C (PKC), hexosamina, nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), xantina oxidasa, y lipooxigenasas 12/15), la disfunción de la eNOS y la interacción entre los productos finales de glicación avanzada y su receptor (AGE-RAGEs), relacionados todos ellos entre sí (58).

A nivel mitocondrial, el funcionamiento en la cadena de transporte de electrones está directamente relacionado con la concentración intracelular de glucosa. En situación de hiperglucemia se produce una saturación de este sistema, que produce una transferencia de electrones a moléculas de oxígeno, formando radicales libres  $O^{2-}$ , que puede ser transformado por el superóxido dismutasa (SOD) a  $H_2O_2$  y a  $OH$ , lo que produce el daño mitocondrial y la formación de poros en la membrana de la mitocondria.

La fosforilación oxidativa mitocondrial proporciona el 90% de la producción intracelular de ATP en los cardiomiocitos, pero en DM2 las mitocondrias cambian la oxidación de glucosa por AGL para la producción de ATP. Este cambio metabólico conlleva una mayor producción de EROs mitocondrial y disfunción en la fosforilización oxidativa. Además, la alteración en el intercambio de  $Ca^{2+}$  en la cadena respiratoria, empeora la disfunción y conlleva muerte mitocondrial (49,59).

En la mitocondria, los EROs son producto del metabolismo del  $O_2$  en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (60). En condiciones fisiológicas, el gradiente de protones se utiliza para la síntesis de

ATP. Pero, en situaciones de hiperglucemia, la RI aumenta el flujo de NADH y dinucleótido de adenina y flavina (FAD) por la cadena respiratoria; es decir, un aumento del EO y EROs, lo que produce una hiperpolarización en la membrana, inhibición del transporte de electrones y mutaciones proteicas (60,61). Esta mayor producción de EROs es causante de la disfunción metabólica, muerte celular y alteración funcional miocárdica, produciendo daño intermediario a nivel de síntesis de proteínas (como colágeno y fibronectina), fosfolípidos y ADN nuclear, entre otros (49,62).

### **1.3.5 Disfunción endotelial**

Pese a que la MCD se define clásicamente en el contexto de ausencia de EC, habitualmente se relacionan entre sí. La alteración de la regulación en la microvasculatura coronaria altera el flujo sanguíneo coronario, perfusión miocárdica, la función ventricular y como consecuencia de ello, se producen los eventos CV.

Furchgott y Zawadzki describieron, en 1980, la existencia de un factor derivado del endotelio con capacidad vasorrelajante, el ON, cuya producción tiene lugar mediante la conversión de L-Arginina en L-Citrulina, catalizada por la enzima eNOS y considerado en la actualidad el compuesto vasodilatador más importante del organismo (35). La alteración en la bioactividad del ON parece un factor clave en la disfunción endotelial y fisiopatología de la DM (63).

El correcto funcionamiento del sistema endotelial depende de la síntesis de eNOS mediante la óxido nítrico sintasa (NOS). Existen 3 isoformas de NOS: óxido nítrico sintasa (eNOS), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Para que esto ocurra, es necesario el acoplamiento

entre eNOS y su sustrato L- Arginina, utilizando como cofactor la Tetrahidrobiopterina (BH4) para la síntesis de ON (64). BH4 es sintetizado por la enzima Guanosina Trifosfato Ciclohidrolasa I (GCH1) primera enzima limitante de este proceso. Bajo condiciones de EO, BH4 es transformado a 7,8 dihidrobiopterina (BH2), promoviendo el desacoplamiento de la eNOS y la síntesis de  $O^{2-}$ , en lugar de ON (58).

Brownlee y col., en el año 2001, expusieron una teoría “unificada” sobre los mecanismos que producen EO y daño endotelial en la DM. Estableció que la hiperglucemia lleva a un incremento en la producción de  $O^{2-}$  mitocondrial en la cadena de transporte de electrones, a través de 4 vías distintas (65): el aumento de la vía de los polioles, la cual fue una de las primeras hipótesis relacionadas con el daño vascular en la DM (66), la sobreproducción de los AGEs, la activación de la PKC, y la activación de la vía de la hexosamina (63).

#### Aumento de la vía de los polioles o sorbitol

La vía del sorbitol está involucrada en la degradación de la glucosa hacia sorbitol y fructosa (67), produciéndose una secuencia de 2 reacciones en las que intervienen la enzimas aldosa reductasa, que requiere NADPH como coenzima para reducir la glucosa a sorbitol y la sorbitol deshidrogenasa, que produce la oxidación del sorbitol a fructosa y utiliza como coenzima el NAD. Las causas por la que puede producir daño tisular en DM son, la depleción del NADPH intracelular; el incremento de la concentración de fructosa y la acumulación del sorbitol (68).

La captación de glucosa celular tiene gran afinidad por la glucokinasa, que produce su fosforilación, pero el 5% de la glucosa no es fosforilada y será metabolizada por la vía de los polioles. En hiperglucemia mantenida, este

porcentaje se incrementa por 4-5 veces (67), lo que produce una disminución de la concentración de NADPH, molécula requerida para mantener el estado redox intracelular. Las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión reductasa tienen como cofactor enzimático al NADPH, por lo que su déficit provocaría la inhibición de las enzimas antioxidantes, un descenso en la concentración intracelular de glutatión reducido (GSH) y un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sus productos de oxidación (69).

La fructosa intracelular puede ser utilizada en la ruta glucolítica como fructosa-6-fosfato o como fructosa-1-fosfato, sin embargo, en la DM la enzima necesaria, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) está disminuida, por lo que en este contexto de sobreproducción se produce su acúmulo y toxicidad.

#### Sobreproducción de productos finales de la glicación avanzada e interacción con su receptor.

La hiperglucemia crónica lleva a la unión no enzimática de los carbohidratos con lípidos y proteínas, en un proceso conocido como glicación. Estos lípidos y proteínas alterados pueden unirse al receptor de membrana de AGEs, RAGE, presente en la membrana de células endoteliales y macrófagos. Esta unión desencadena una reacción en cascada que va a producir EROs y citoquinas pro-inflamatorias.

La producción de los precursores de AGE a nivel intracelular va a generar células dañadas mediante tres mecanismos. En primer lugar, la modificación de las proteínas a nivel intracelular en los AGEs va a hacer que puedan verse alteradas las funciones de esa proteína. En segundo lugar, la modificación de la matriz extracelular de los AGEs va a hacer que se modifiquen las interacciones

con otros componentes de la matriz por alteración en sus receptores. En tercer lugar, la presencia de metilglioxal intracelular, subproducto de la glicólisis, aumenta la expresión del receptor R-AGE y sus ligandos (70). A nivel miocárdico el metilglioxal, en el paciente con DM, reacciona principalmente mediante dos receptores, por un lado, RyR y con la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endo/sarcoplasmático 2a (SERCA2a), ambos relacionados con el intercambio iónico de calcio a nivel intracelular y en retículo sarcoplásmico, respectivamente. Por tanto, el aumento de AGE y su unión AGE-RAGE a nivel miocárdico, va a producir una contracción miocárdica deletérea, con evolución a disfunción miocárdica típica de la CMD (70).

#### Aumento de la Proteína Kinasa C

Las PKC son una familia de isoenzimas que son activadas por el diacilglicerol (DAG), compuesto que se eleva en el interior de células expuestas a hiperglucemia, debido a la elevación de los metabolitos NADH por la vía de los polioles y la acumulación de fructosa. No todas las isoformas PKC tienen la misma reacción frente a la hiperglucemia. Así, la isoforma PKC delta es la que parece estimular el EO mediado por la activación de la enzima NADPH oxidasa (67,68). A su vez, las isoformas PKC pueden ser activadas, en ausencia de DAG, por EROs (70).

#### Activación de la vía de la hexosamina

La acumulación de fructosa estimula la actividad de la vía de las hexosaminas. La O N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina-glicosilación u O-GlcNacilación (O-GlcNac), requerida en esta ruta metabólica, produce a su vez inhibición de eNOS. La elevación crónica de la O-GlcNac, también se ha relacionado con el

deterioro de la contractilidad miocárdica por inhibición de la función de la SERCA2 y CaMKII (70).

### **1.3.6 Mecanismos epigenéticos**

Existen estudios, que se comentarán de forma detallada en el tratamiento de la DM2, que muestran reducción del riesgo de ECV y muerte mediante el control intensivo de la glucemia. De ello se dedujo que, si el control intensivo de la glucemia se realiza precozmente en las etapas iniciales de la enfermedad, las complicaciones de la DM pueden prevenirse, incluso después de abandonar el control intensivo. Sin embargo, una vez establecida la hiperglucemia, la evolución del daño en órganos diana es inevitable. Este fenómeno de estrés vascular persistente, incluso en estado de euglucemia, es conocido como "memoria metabólica" y puede relacionarse con las alteraciones epigenéticas inducidas por DM. Estos mecanismos epigenéticos pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de CMD, particularmente para la memoria metabólica, tales como acetilación de histonas, metilación del ADN y desregulación de partículas de ARN no codificantes (miARNs) (49).

El estado de hiperglucemia, la inflamación y el EO son capaces de modificar la expresión génica por mecanismos epigenéticos para iniciar los cambios patogénicos en las células y órganos diana (48). La MCD se asocia con una mayor expresión de miARNs. Los miARNs controlan la expresión transcripcional y postranscripcional génica y regulan la función mitocondrial, la producción de EROs, y fibrosis, mecanismos relacionados con la remodelación y fibrosis miocárdica, producción de MCD y progresión a IC (46).



pacientes del grupo de EMPA mostraron una reducción significativa en la muerte por causa CV, riesgo significativamente menor de muerte por cualquier causa, y disminución en la hospitalización por IC respecto al grupo control, con una diferencia no tan significativa en cuanto a HbA1c en ambos grupos al finalizar el estudio (72), resultados no esperables previamente a su inicio y, se dedujo, que los beneficios a nivel CV podrían ser multidimensionales (72), implicando cambios tanto a nivel CV, renal, como efectos sobre la glucemia, HTA, peso y adiposidad.

Dada la relación entre la IC y la DM, la prevención de la IC podría ser a su vez sinónimo de prevención de DM y RI y viceversa. Hasta ahora, el objetivo de tratamiento era mejorar la glucemia sin agravar la retención de fluidos, ni incrementar peso y sin aumentar el riesgo CV. Ahora, nuevas dianas terapéuticas nos permiten abordar estas entidades clínicas de forma conjunta (39); por ello los estándares de tratamiento de la DM han dado un gran giro. Vamos a hacer un repaso de los estudios de seguridad CV presentes hasta el momento y de las diferentes dianas terapéuticas para la DM.

#### **1.4.1 Ensayos clínicos en Diabetes Mellitus y seguridad cardiovascular**

En cuanto a objetivos de tratamiento, el primero que se estableció, a partir de los resultados en DM1 del estudio Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications (DCCT/EDIC), fue el tratamiento intensivo de la DM para la prevención de eventos macro y microvasculares, hipótesis no tan aceptada en la actualidad. Por ello, a día de hoy, hay que establecer el tratamiento y los objetivos de control de forma individualizada en función del perfil del paciente.

El DCCT/EDIC demostró que, en DM1, el control intensivo de la glucemia redujo la tasa de cualquier evento CV en un 42% y la de IM, ictus o muerte CV en un 57%, con respecto al tratamiento convencional (73).

#### **1.4.1.1 DCCT: *The Diabetes Control and Complications Trial (74–76).***

Este estudio, realizado entre 1983 y 1993, se realizó con la intención de demostrar que, mantener los niveles de glucosa “lo más cerca posible de lo normal” (definido por HbA1c del 6%) es decir, control intensivo de la diabetes frente al tratamiento convencional, podía retrasar el inicio y la progresión de nefropatía, neuropatía y retinopatía diabética.

El DCCT incluyó a 1,441 voluntarios, entre 13 y 39 años con DM1 diagnosticada al menos 1 año previo al inicio, pero no más de 15 años de evolución. El principal resultado evaluado fue la retinopatía diabética. Los resultados obtenidos mostraron que el control intensivo producía una reducción del 76% del riesgo de retinopatía, del 50% de nefropatía y del 60% de polineuropatía diabética.

#### **1.4.1.2 EDIC: *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (75,76).***

Una vez finalizado DCCT en 1993, se mantuvo el seguimiento de más del 90% de los participantes, lo que supone este estudio EDIC, de seguimiento del DCCT. En él se evaluaron la incidencia y los predictores de eventos CV como IM, ACV o cirugía cardíaca y las complicaciones microvasculares comparando el control intensivo con el control estándar. El control intensivo de la glucemia

redujo el riesgo de ECV de cualquier causa en un 42% y de IM no fatal, ACV o muerte por causas CV en un 57%.

#### **1.4.1.3 UKPDS: UK Prospective Diabetes Study (UKPDS)(77–79)**

Ensayo prospectivo, iniciado en 1977 en DM2, que mostró que el control intensivo de la DM, definido como glucemia basal de 108 mg/dl y HbA1c media de 7% con tratamiento con sulfonilurea y/o insulina, frente a tratamiento convencional, estaba asociado a una disminución de las complicaciones microvasculares (retinopatía y nefropatía diabética). El objetivo inicial del estudio era determinar si el control exhaustivo reducía el riesgo de complicaciones microvasculares y/o macrovasculares y si existía algún tratamiento que pudiera ser ventajoso.

Los resultados del UKPDS se podrían resumir en una reducción del riesgo de complicaciones microvasculares del 25% con terapia intensiva de tratamiento, con una relación directa entre la disminución de la glucemia y las complicaciones microvasculares, produciéndose un descenso del 35% del riesgo por cada punto de reducción de HbA1c, sin diferencia significativa en la reducción en las complicaciones CV. Se mostró una reducción del 16%, sin ser estadísticamente significativa ( $P = 0.052$ ), en el riesgo combinado de IM fatal o no fatal y de muerte súbita, por tanto, no se pudo mostrar que el control intensivo de la glucemia en DM2 modifique la evolución de la ECV. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas según los tratamientos utilizados.

A partir de estos resultados, la American Diabetes Association (ADA) determinó el objetivo de HbA1c  $< 7\%$  para la mayoría de los pacientes diabéticos adultos y, para intentar determinar los beneficios del control estricto de la

glucemia sobre el riesgo de ECV en DM2, se iniciaron los estudios ADVANCE, VADT y ACCORD.

#### **1.4.1.4 ACCORD: Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (80).**

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto sobre la morbimortalidad CV en DM2 del tratamiento intensivo de la glucemia (estudio ACCORD-glycemia), presión arterial (ACCORD-BP) y lípidos (ACCORD-Lipids).

ACCORD-glycemia se realizó en pacientes con DM2 y ECV o alto RCV, que se aleatorizaron en dos grupos de tratamiento, intensivo con objetivo de HbA1c < 6.0% y estándar, con HbA1c entre 7.0%-7.9%, siendo el criterio principal de valoración la combinación de IM, ACV y mortalidad CV. El estudio tuvo de finalizar precozmente por un aumento de la mortalidad en la rama de tratamiento intensivo (hazard ratio [HR] = 1.22) y los pacientes pasaron a recibir el tratamiento estándar. Pese a que hubo una disminución del criterio principal de valoración en esta rama de tratamiento, no fue estadísticamente significativa en relación con el tratamiento convencional al final del estudio ( $p = 0.16$ ). En los subanálisis del estudio no se pudo determinar la causa de la mayor mortalidad evidenciada en la rama de tratamiento intensivo, pero se atribuyó a los eventos de hipoglucemia.

#### **1.4.1.5 ADVANCE: Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax (perindopril e indapamida) and Diamicron MR (gliclazida) Controlled Evaluation (81).**

En este estudio, cuyo objetivo principal fue valorar la combinación de complicaciones microvasculares (nefropatía y retinopatía) y eventos CV (IAM,

ACV y muerte CV), intervinieron pacientes con DM2 y un riesgo de ECV similar al estudio ACCORD que se aleatoriza con a control intensivo o convencional de la glucemia. Se mostró una reducción significativa del criterio principal con el tratamiento intensivo (HR = 0.90, p = 0.01) atribuible a la reducción de las complicaciones microvasculares (HR = 0.86, p = 0.01), sin significación estadística en los eventos CV (HR = 0.94, p = 0.32) ni mayor mortalidad global o CV en el tratamiento intensivo pese a un mayor número de hipoglucemias severas respecto al control.

#### **1.4.1.6 VADT: Veterans Affairs Diabetes Trial (82).**

Similar a ACCORD y ADVANCE, VADT tuvo como objetivo comparar los efectos del control intensivo, definido como reducción absoluta de HbA1c del 1.5%, frente al control estándar sobre los eventos CV en militares veteranos con DM2 de larga evolución, con un control subóptimo, definido como HbA1c media  $9,4 \pm 2\%$ , y con algún tipo de evento CV en el 40% de los participantes. El objetivo primario fue el tiempo transcurrido desde la aleatorización a la rama de tratamiento hasta el primer evento CV mayor y la combinación de IM, ACV, muerte CV, IC, cirugía por ECV, enfermedad coronaria inoperable y amputación.

En 264 pacientes del grupo de terapia estándar y en 235 del grupo de terapia intensiva tuvo lugar el objetivo primario (HR 0.88; 95% IC, 0.74 a 1.05; p=0.14), sin diferencias significativas en los componentes del objetivo primario o en la tasa de muerte por cualquier causa entre grupos (HR 1.07; 95% IC, 0.81 a 1.42; p=0.62).

El tratamiento intensivo de la DM se relacionó, en el análisis de subgrupos, con beneficio en el riesgo de ECV en aquellos diabéticos de menor evolución,

mejor control desde el inicio o ausencia de ECV conocida. De forma similar, durante el seguimiento a 10 años de los pacientes del UKPDS, los diabéticos con control intensivo mostraron disminución de la tasa eventos de IM y de mortalidad por todas las causas. Por ello, se puede considerar que un buen control metabólico en las etapas iniciales de la DM2 puede asociarse a un beneficio en la ECV.

Pese a los avances en los tratamientos, el riesgo de ECV en la DM sigue siendo muy elevado. A partir de los hallazgos evidenciados con el uso de la Rosiglitazona, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) emitió un mensaje a la industria farmacéutica en el que se exigía seguridad CV para nuevos tratamientos en DM2. Posteriormente, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se posicionó junto a la FDA en este sentido. El objetivo primario exigido era, inicialmente, mostrar seguridad CV en un evento combinado compuesto de muerte CV, IM y ACV, definido como MACE, sin evaluar la IC como un resultado independiente. Aunque es entendible pensar que los beneficios de estos fármacos en reducción de MACE podrían traducirse en beneficios a largo plazo en IC, esta conclusión debe investigarse de forma específica, ya que no era un criterio independiente a estudio.

Esto es muy relevante para la práctica clínica, ya que el tratamiento de DM2 e IC sigue siendo un paradigma para los cardiólogos y endocrinólogos. En esta línea, 10 años después de las exigencias de la FDA y la EMA, se sugiere incluir hospitalización por IC como parte del objetivo primario de los ensayos de seguridad CV, además de MACE. De hecho, en futuros ensayos debe ser considerado como un evento individual. Cabe señalar que los principales ensayos clínicos de seguridad cardiovascular (CVOT) que evalúan los nuevos

tratamientos no se realizaron específicamente en pacientes con IC, puesto que no era un requisito específico y obligatorio. Una vez contextualizado, comentaremos brevemente los resultados de los principales ensayos que han mostrado beneficio en cuanto a MACE.

#### **1.4.1.7 CVOTs en Diabetes Mellitus y su beneficio cardiovascular (83,84)**

##### **1.4.1.7.1 EMPA-REG OUTCOME (Empaglifozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Removing Excess Glucose)**

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, diseñado para evaluar la seguridad de EMPA, un iSGLT-2 en pacientes con DM2 con ECV. El objetivo primario fue MACE-3 (muerte CV, IM y ACV), con una mediana de seguimiento de 3,1 años. EMPA mostró una reducción del riesgo de MACE-3 (10.5% vs. 12.1%; HR 0,86; IC 95%, 0,74–0,99; p = 0.04 para superioridad). Además, la terapia con EMPA redujo significativamente la tasa de hospitalización por IC (2.7% vs. 4.1%; HR 0.65; 95% CI, 0,50–0,85; p = 0.002), y el riesgo de MACE en el subgrupo IC.

##### **1.4.1.7.2 LEADER (Liraglutide effect and action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results)**

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad de Liraglutida, análogo de GLP-1 en pacientes con DM2 con ECV establecida si > 50 años, o alto RCV si > 60 años, con una mediana de seguimiento de 3,8 años. El objetivo primario fue el MACE-3. Liraglutida mostró una reducción del riesgo de MACE 3 (13.0% vs. 14.9%; HR 0,87; IC 95%, 0,78–0,97; p = 0,001 para no inferioridad), sin mostrar diferencias

en la tasa de hospitalización por IC (4.7% vs.5.3%; HR 0.87; IC 95%, 0.73–1.05;  $p = 0.14$ ), ni riesgo de MACE en el subgrupo IC.

#### *1.4.1.7.3 SUSTAIN-6 (Trial to Evaluate Cardiovascular and Other Long-term outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes)*

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad de Semaglutida, análogo de GLP-1 en pacientes con DM2 con ECV o ERC en > 50 años de edad o alto RCV si > 60 años, con una mediana de seguimiento de 2,1 años. El objetivo primario fue el MACE-3. Semaglutida redujo el riesgo de MACE-3 (6.6% vs. 8.9%; HR 0.74; IC 95%, 0.58–0.95;  $p = 0,001$  para no inferioridad), sin evidenciar un aumento en la tasa de hospitalización por IC (3.6% vs.3.3%; HR 1,11; IC 95%, 0,77–1,61;  $p = 0,57$ ), ni riesgo de MACE en subgrupo de IC.

#### *1.4.1.7.4 CANVAS (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study)*

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad de Canaglifozina, iSGLT-2 en pacientes con DM2 y ECV o con alto riesgo CV, con una mediana de seguimiento de 3,2 años. El objetivo primario fue seguridad respecto al MACE-3. Canaglifozina redujo el MACE-3 y la tasa de hospitalización por IC (HR 0,67; IC 95%, 0,52–0,87). Sin embargo, no se evidenciaron beneficios en MACE en el subgrupo IC.

A su vez, se realizó con esta misma diana terapéutica, CREDENCE (Canagliflozin and Renal Events in Diabetes with Established Nephropathy Clinical Evaluation), ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad de Canagliflozina en DM2 y nefropatía. El estudio finalizó previamente a lo planeado, con una mediana de

seguimiento de 2.62 años, por cumplir criterios de eficacia. Canagliflozina redujo el objetivo primario de enfermedad renal terminal, empeoramiento de la función renal y muerte por enfermedad renal o CV. Además, mostró una reducción en la tasa de hospitalización por IC (HR 0,61; IC 95%, 0,47–0,80), sin beneficio del objetivo primario en el subgrupo IC.

#### 1.4.1.7.5 HARMONY

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad de Albiglutida, agonista del receptor GLP-1 en pacientes con DM2 y ECV, con una mediana de seguimiento de 1,5 años. El objetivo primario fue el MACE-3. La albiglutida redujo el riesgo de MACE-3 (7% frente a 9%; HR 0,78; IC 95%, 0,68–0,90;  $p < 0,0001$  para no inferioridad;  $p < 0,0006$  para superioridad). A su vez, redujo las tasas de MACE para el subgrupo IC (10.6% vs.15.1%; HR 0.7; IC 95%, 0,54–0,90). Sin embargo, no hubo un beneficio significativo en el objetivo secundario de muerte por causa CV u hospitalización por IC.

#### 1.4.1.7.6 DECLARE TIMI 58 (*Dapagliflozin Effect on Cardiovascular Events-Thrombolysis in Myocardial Infarction*)

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad de Dapagliflozina, iSGLT-2 en DM2 con ECV o múltiples FRCV, con una mediana de seguimiento de 4,2 años. A destacar, es el único ensayo que realizó un estudio detallado sobre la FE del VI. Sus objetivos primarios de eficacia incluyeron el tiempo hasta la aparición de MACE y hasta la aparición del compuesto de muerte CV u hospitalización por IC. Dapagliflozina logró alcanzar el criterio de no inferioridad, pero no el de superioridad frente a

placebo en la reducción del objetivo MACE, sin reducción significativa de éste (HR 0,93; IC 95%: 0,84-1,03; p = 0,17), pero sí se redujo el objetivo combinado de muerte CV u hospitalización por IC (HR 0,83; IC 95%: 0,73-0,95; p = 0,005) a expensas de la reducción de ingresos por IC (HR 0,73; IC 95%: 0,61-0,88), sin diferencias significativas en la mortalidad CV (HR 0,98; IC 95%: 0,82-1,17).

#### *1.4.1.7.7 REWIND (Researching Cardiovascular Events with a Weekly Incretin IN Diabetes)*

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo diseñado para evaluar la seguridad y eficacia de Dulaglutida, análogo de GLP1 en pacientes con DM2 con alto riesgo CV o enfermedad renal. La mayoría de los participantes en REWIND no tenían ECV previa. El objetivo primario fue la aparición del compuesto MACE-3, con una mediana de seguimiento de 5.4 años. Dulaglutida redujo el riesgo de MACE-3 (12.0% vs. 13.4%; HR 0,88; IC 95%, 0,79–0,99; p 0.02), y de ACV (3.2% vs. 4.1%; HR 0.76; IC 95%, 0.62–0,94; p <0,01). Sin embargo, dulaglutida no modificó la tasa de hospitalización por IC (4.3% vs. 4.6%; HR 0.93; IC 95%, 0,77-1,12; p = 0,46).

Además de estos ensayos clínicos comentados y resumidos en la Tabla 1, se han realizado estudios en “vida real”, derivados de datos de observación de pacientes, cuyos resultados son consistentes con los resultados de los CVOTs. Por ejemplo, en el EMPRISE (85) (Empaglifozin comparative effectiveness and safety) mostró la efectividad, seguridad e impacto clínico de la empaglifozina en vida real. El ensayo CVD-REAL, se evalúa el riesgo de hospitalización por IC y muerte por cualquier causa, en personas con DM2 tratados con i-SGLT2, frente al uso de otros fármacos antidiabéticos no insulínicos. Incluye más de 300.000 pacientes, muchos de ellos sin antecedentes previos de ECV, ha demostrado

que el tratamiento con distintos i-SGLT2 (canagliflozina, dapagliflozina y EMPA) redujo las tasas de hospitalización por IC en un 39% (HR 0,61; IC 95%: 0,51–0,73; p<0,001) y la muerte por cualquier causa en un 51% (HR 0,49; IC 95%: 0,41–0,57; p<0,001) cuando se comparaba su uso con el de otros fármacos antidiabéticos. El análisis del criterio combinado de hospitalización por IC y muerte por cualquier causa, encontró una reducción del 46% (HR 0,54; IC 95%: 0,48–0,60, p<0,001) con el uso de i-SGLT2 (86,87). La mayor parte de la evidencia acumulada es clara y consistente e indica que la terapia con los i-SGLT2 está asociada con una reducción de IC, que es independiente del control glucémico.

FAMILIA TERAPÉUTICA	ENSAYO	FÁRMACO	MACE	HIC Prevención primaria	MACE IC Prevención secundaria
a-GLP1	ELIXA	Lixisenatida	No (1.02)	No (0.96)	22.4% No (ND)
	LEADER	Liraglutida	R (0.87)	No (0.87)	18.2% No (0.94)
	SUSTAIN-6	Semaglutida	R (0.74)	No (1.11)	23.6% No (1.03)
	EXSCEL	Exenatida	No (0.91)	No (0.94)	16.2% No (0.97)
	REWIND	Dulaglutida	R (0.88)	No (0.93)	8.6% No (ND)
	HARMONY OUTCOMES	Albiglutida	R (0.78)	No (0.85)	R (0.7)
i-SGLT2	EMPAREG OUTCOMES	Empaglifozina	R (0.86)	R (0.86)	R (0.71)
	CANVAS PROGRAM	Canaglifozina	R (0.86)	R (0.86)	14.4% No (0.8)
	DECLARE-TIMI 58	Dapaglifozina	No (0.93)	No (0.93)	10% No (1.01)
	CREDESCENCE	Canaglifozina	R (0.70)	R (0.70)	14.8% No (0.89)

Tabla 1. CVOTs en Diabetes Mellitus y su beneficio cardiovascular. Datos expresados en Hazard Ratio, comparado con grupo control. No (No diferencias), R (reducido), I (Incrementado), es el efecto del fármaco. El porcentaje de la última columna (%), se refiere a la prevalencia previa de IC En los pacientes del Ensayo Clínico. ND= no disponible, MACE= Evento cardiovascular mayor. HIC= Hospitalización por IC. MACE IC= MACE en la cohorte de IC. Adaptado de Cattadori G. y Col.

## **1.4.2 Fármacos para la DM**

Como hemos comentado previamente, los nuevos tratamientos para la DM han supuesto un cambio en los algoritmos de tratamiento tanto para la DM2 como para la IC. Vamos a describir brevemente las distintas dianas terapéuticas y las últimas recomendaciones de tratamiento en la DM2.

### **1.4.2.1 Metformina**

Puede seguir considerándose el fármaco oral hipoglucemiante estrella y en la actualidad está considerado como el primer escalón farmacológico en DM2, prácticamente al nivel de la intervención en estilo de vida con alimentación y actividad física.

La metformina procede de la familia de las biguanidas, se conocen desde principios del siglo XX, concretamente en 1918 con la Guanidina. En el grupo de las biguanidas, existían otros dos compuestos como la Fenformina y la Buformina que fueron retirados por estar relacionados con fenómenos de acidosis láctica, complicación más temida de este grupo terapéutico. Tiene una eficacia de disminución de la HbA1c potente, de entre 1-2%. Su mecanismo de acción es fundamentalmente hepático mediante el aumento de la sensibilidad a la insulina, inhibición de la neoglucogenesis y mayor captación de glucosa a nivel periférico en tejido muscular. La metformina inhibe selectivamente en la mitocondria la glicerolfosfato deshidrogenasa, reduce la dihidroxiacetona fosfato citosólico y aumenta el NADH/NAD citosólico, lo que produce la reducción de las concentraciones plasmáticas de glucosa y lactato y reduce la gluconeogénesis y secreción hepática de glucosa.

El UKPDS 34 y el estudio sobre el pronóstico y efecto de los fármacos antidiabéticos en DM2 con enfermedad coronaria (SPREAD-DIMCAD), mostró reducciones significativas en eventos de ECV con metformina, mantenidas tras 10 años de seguimiento tras finalizar el estudio (73).

La eliminación del fármaco se lleva a cabo en su totalidad por vía renal, siendo éste su principal limitante, ya que dentro de las contraindicaciones se encuentra la insuficiencia renal, siendo preciso ajustar la dosis al filtrado glomerular.

#### **1.4.2.2 Glitazonas o tiazolidindionas**

Fármacos desarrollados en la década de los 80, con dos moléculas, la Pioglitazona y la Rosiglitazona. Esta última, la Rosiglitazona fue retirada del mercado por mostrar un aumento de eventos de IC. Se trata de un fármaco potente, que puede disminuir la HbA1c entre un 0,5-2%, siendo su mecanismo de acción el aumento de la sensibilidad a la insulina mediante la captación de glucosa en tejido graso y muscular, por acción agonista sobre receptores de factores de transcripción PPAR- $\gamma$ .

Sus efectos secundarios derivan de su mecanismo de acción, al facilitar la captación de glucosa en músculo y tejido graso produce una mayor retención hidrosalina con edemas y aumento de peso, lo que puede provocar en pacientes predispuestos o con patología de base cardíaca una descompensación. Por ello, en sus contraindicaciones se encuentran los pacientes con CI e IC grado III y IV de la NYHA.

En el ensayo clínico PROACTIVE se analizó el posible beneficio de la pioglitazona a nivel CV. Se incluyeron 5238 pacientes DM2 con enfermedad

cardiovascular establecida (46% IAM previo, 48% CAD y 18% ACV), mal control de DM2 (HbA1c media 8.1%) y FRCV asociados. El objetivo primario fue prevención secundaria de eventos CV (incluyendo EVP) añadiendo pioglitazona al tratamiento habitual y el objetivo secundario disminución de MACE-3. No se mostró evidencia significativa en el objetivo primario, sin embargo, sí se mostró beneficio significativo en el objetivo secundario MACE-3, pero con un aumento de los casos de IC en el grupo de pioglitazona, sin aumento en la mortalidad por IC. Por ello se sugiere que la pioglitazona puede aumentar la incidencia de IC sin un aumento en la mortalidad. Esto se comprobó posteriormente, en un estudio de seguimiento de los pacientes PROACTIVE, 10 años tras finalizar el estudio, en el que se muestra que los pacientes en tratamiento con pioglitazona no tienen diferencias respecto a placebo ni en objetivo primario, secundario ni muerte de cualquier causa CV (73).

### **1.4.2.3 Sulfonilureas**

Estos fármacos han sido grandes protagonistas del tratamiento oral hipoglucemiante en la historia de la DM2, actualmente relegados a un segundo plano debido a las nuevas dianas terapéuticas. Su mecanismo de acción principal es el estímulo de la secreción de insulina endógena mediante el cierre de los canales de  $K^+$ , lo que produce la despolarización de la membrana y el paso del  $Ca^{2+}$  al interior celular, tras la unión a su receptor de membrana. Las sulfonilureas fueron desarrolladas en la década de los 50 y su molécula es un derivado de las sulfonamidas. Son fármacos potentes en cuanto a mejoría del control glucémico global con una disminución del 1-2% de la HbA1c. Existen varios fármacos dentro de este grupo, los de primera generación como la

Clorpropamida, segunda generación más modernos como la Glibenclamida, Glimepirida, Glicazida, Glipicida que se han impuesto por tener un perfil de seguridad mayor sobre su principal inconveniente que son las hipoglucemias. Entre sus efectos secundarios encontramos las hipoglucemias no glucosa-dependientes, con aumento del número de ingresos hospitalarios por este motivo y la ganancia ponderal, con una media de entre dos y cinco kg de peso, por lo que son fármacos menos utilizados en la actualidad.

#### **1.4.2.4 *Metiglinidas***

Son fármacos que se encuadran en el grupo de los secretagogos, estimulando la secreción de insulina por inhibición de los canales  $K^+$  dependientes de ATP, pero su duración es menor que la de las sulfonilureas y poseen una acción más rápida lo cual deriva en un menor riesgo de hipoglucemia. Su vía de eliminación es hepática, por lo que son seguros en la enfermedad renal sin requerir ajuste de dosis. Existen principalmente dos fármacos en este grupo, la Repaglinida y la Nateglinida. Su eficacia en cuanto a disminución de la HbA1c es del 0,5-1,5%. Entre sus efectos secundarios el más importante es el riesgo de hipoglucemias, menos frecuentes y menos graves respecto a las sulfonilureas.

#### **1.4.2.5 *Inhibidores de alfa glucosidasas***

Actúan disminuyendo la absorción intestinal de hidratos de carbono mediante la inhibición de las disacaridasas intestinales que impiden la hidrólisis de los oligosacaridos en el intestino delgado y así alcanzan el colon sin ser

digeridos. Estos fármacos fueron desarrollados en las décadas de los 80 y 90, siendo aprobados para su uso en 1996. Son dos los principales fármacos de este grupo, el Miglitol y la Acarbosa, menos potentes en cuanto a disminución de la HbA1c, con una reducción del 0,5-0,7%. Sus efectos secundarios derivan de su propio mecanismo de acción, pudiendo producir molestias digestivas, diarrea, meteorismo o flatulencias.

#### **1.4.2.6 Fármacos del sistema incretina**

El sistema incretina surgió de ensayos en los que se estudió la respuesta en la secreción de insulina cuando se ingería glucosa vía oral respecto a la administración de ésta de forma parenteral. Se observó que cuando se administra por vía parenteral, la secreción pancreática de insulina era inferior respecto a la administración de la misma cantidad por vía enteral, produciendo en este caso una mejor respuesta glucémica. Es a este fenómeno lo que se conoce como efecto incretina y supone un incremento de la secreción de insulina mediado por péptidos intestinales que se liberan ante la presencia de glucosa en el intestino. Las principales incretinas son el Polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el Péptido similar al Glucagón-1 (GLP-1), en base a las cuales se han desarrollado los fármacos mediados por esta vía de acción. La enzima dipeptidil-peptidasa 4 (DPP-4), inactiva la acción del GLP-1 de forma inmediata. En los pacientes con DM el sistema incretina es disfuncionante, suele estar disminuido o suprimido por lo que los fármacos del sistema incretina se dirigen en dos direcciones, para inhibir la enzima DPP-4 y así potenciar el efecto del GLP1 o con análogos del GLP-1. Ambos son glucosa-dependientes, por lo que tienen bajo riesgo de hipoglucemia.

#### *1.4.2.6.1 Inhibidores de la enzima DPP-4 (dipeptidil-peptidasa 4)*

Son fármacos de administración oral que, al prolongar la acción de las incretinas endógenas por el bloqueo de la enzima DPP-4, permiten que se prolongue el efecto GLP-1 endógeno, de este modo mejoran la secreción de insulina por la célula  $\beta$ -pancreática con disminución de la glucemia postprandial, reducción de la producción de glucagón y proliferación de la célula  $\beta$ -pancreática. Tienen una potencia moderada en mejoría de HbA1c, 0,5% y el 0,9% y no influyen en el peso. Todos requieren ajuste según filtrado glomerular a excepción de linagliptina.

#### *1.4.2.6.2 Agonistas del receptor del GLP-1*

Comercializados desde el año 2006 y su eficacia está contrastada en cuanto a un mejor control metabólico (mejora la sensibilidad a la insulina, la estimulación de la secreción de insulina y la disminución de la secreción de glucagón) como también por su beneficio CV, ya comentado previamente. Son potentes en cuanto a disminución de la HbA1c, con un valor medio que oscila entre el 1,0% y el 1,5% de la HbA1c. En cuanto a efectos secundarios, principalmente se presentan a nivel gastrointestinal.

#### **1.4.2.7 Glucosuricos**

Son los más recientes en el mercado de los fármacos de la DM2. La inhibición de la reabsorción de glucosa es una nueva estrategia para el tratamiento de la DM, ya que el riñón tiene un rol importante en la homeostasis de la glucosa (88). En condiciones normales la glucosa es filtrada por el riñón, y reabsorbida casi completamente por el túbulo proximal, de manera que con

glucemias inferiores a 180 mg/dl el 99% de la glucosa filtrada va a ser reabsorbida, eliminándose tan sólo el 1%. En DM, cuando la glucemia plasmática es superior a 180 mg/dl, se supera el dintel renal de reabsorción y se producen dos mecanismos compensatorios, por un lado se incrementa la reabsorción renal en el túbulo proximal por aumento de la expresión renal de transportadores SGLT y, por otra parte, se incrementa la excreción renal de glucosa, puesto que no se puede compensar el exceso de glucosa plasmática (89).

Los responsables de la reabsorción renal de glucosa son los cotransportadores sodio-glucosa o SGLT. Existen dos isoformas, el SGLT1 y SGLT2. En el riñón se expresa predominantemente SGLT2, en la región S1 del túbulo proximal, responsable de la reabsorción del 90% de la glucosa filtrada en glomérulo. En la región S3 del túbulo proximal se encuentra ubicado el cotransportador SGLT1, que reabsorbe el 10% restante de la glucosa filtrada (89). La inhibición selectiva de SGLT2 frente a SGLT1 se ha propuesto como estrategia para promover la excreción renal de glucosa y reducir la glucemia plasmática en pacientes diabéticos.

Producen una reducción de HbA1c de entre el 0,5-0,9% y ponderal de 2-3 kg, sin riesgo de hipoglucemia y con beneficios a nivel CV ya mencionados. Entre los efectos adversos, la infección del tracto genitourinario por glucosuria (balanitis o vulvovaginitis) pueden limitar su uso.

Con todo lo comentado hasta ahora, el clínico debe establecer el tratamiento óptimo basándose en el perfil clínico del paciente y la evidencia en estudios de seguridad CV, ofreciendo el mejor fármaco según riesgo-beneficio. Aun así, no debemos de olvidar que la dieta, el ejercicio y la educación son la base de cualquier programa de tratamiento de la DM.

Los "Estándares de Atención Médica en Diabetes" de la ADA recomiendan en la mayoría de los pacientes con DM reducir la HbA1c por debajo de 7,0% para reducir la incidencia de enfermedad microvascular, definiendo los objetivos de control como una glucemia media <150–160 mg/dl, glucemia basal <130 mg/dl y la glucemia posprandial <180 mg/dl.

Se recomienda un control de HbA1C más estricto <6,5% para pacientes con DM de corta duración, tratada solo con estilo de vida o metformina, larga esperanza de vida y sin enfermedad CV.

Se recomiendan objetivos de HbA1c menos estrictos >7.5-8.0% en pacientes con edad avanzada y esperanza de vida limitada, complicaciones diabéticas avanzadas, comorbilidad asociada, antecedentes de hipoglucemia severa y aquellos en quienes el objetivo de HbA1c es difícil de alcanzar a pesar de la educación intensiva e implementación de tratamiento acorde. Para lograr estos objetivos, se debe hacer seguimiento estrecho y modificaciones de tratamiento de forma continuada según avanza la enfermedad y sus comorbilidades.

## **1.5 Modelo experimental con diabetes e infarto de miocardio.**

### **1.5.1 Inducción de diabetes en modelo animal.**

El modelo animal tiene un papel indudable para permitir el estudio de la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y sus complicaciones.

Existen diferentes modelos biológicos en animales para reproducir las manifestaciones clínicas de la DM humana. Vamos a comentar específicamente

el modelo de animal utilizado en el estudio, en este caso el uso de la rata Wistar y el método de DM por inducción química con estreptozotocina (STZ).

La rata Wistar, desarrollada en 1906 para la investigación en el Wistar Institute, tiene su origen en una línea albina de la rata parda. Presenta valores plasmáticos y estructura celular similar a los seres humanos, por lo cual se ha utilizado como modelo de estudio ampliamente reconocido para diversas patologías.

La STZ, antibiótico derivado de la bacteria *Streptomyces achromogenes*, es un agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucokinasa, induciendo ruptura en el ADN. Es utilizado también como antineoplásico, por su acción citotóxica selectiva para las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos. En su estructura encontramos una glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, que es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa GLUT-2. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica (90). La ventaja de este modelo farmacológico de DM es, que el grado de alteración de las células  $\beta$  puede ser regulado según la dosis de STZ administrada; así, con una dosis elevada y única, la STZ causa de forma rápida y masiva la necrosis de células  $\beta$ , similar a una DM1, y la administración de dosis bajas de STZ conduce a un daño parcial de las células  $\beta$ , mediante la producción de un proceso inflamatorio similar a la DM2 (91).

El modelo de administración de STZ se ha utilizado para estudiar los acontecimientos inmunológicos de insulinitis y muerte celular pero, a dosis bajas, produce DM en ausencia de células T y B, ocasionando cierto grado de toxicidad sobre las células  $\beta$ , que predispone a una reducción y disfunción de células  $\beta$ ,

así como insuficiencia en la secreción de insulina, intolerancia a la glucosa y otras alteraciones típicas de la patogenia de la DM2, permitiendo producir un modelo de DM2 en los roedores ya adultos, como el utilizado en este estudio (92).

Existen cambios metabólicos asociados a la administración de STZ, que se manifiestan en una respuesta trifásica aguda: hiperglucemia temprana debido a la movilización de glucógeno hepático a las 2-4 h sin aumento concomitante de insulina sérica, hipoglucemia debido a un aumento del nivel de insulina sérica en 6-10 h, y una hiperglucemia permanente que se observa 24 h tras su inyección.

Otro aspecto a tener en cuenta es la vía de administración. La STZ se puede inyectar por vía subcutánea, intracardiaca o intramuscular; sin embargo, la más habitual es la intraperitoneal o intravenosa. Aunque las dosis de STZ pueden variar mucho entre el género y la cepa, las dosis > 65 mg/kg se consideran dosis altas, 40-55 mg/kg son moderadas y <35 mg/kg son dosis bajas. No existen protocolos estandarizados para la preparación y administración de STZ. Generalmente, STZ se disuelve en solución salina o tampón citrato (93).

El parámetro más relevante en la caracterización de DM de este modelo de diabetes es el tiempo dosis-respuesta, el cual permite identificar el tiempo de inducción necesario (tiempo después de la administración de STZ en el cual el mayor porcentaje de los animales se convierten en DM), que según la literatura oscila entre 3 y 5 días. Comparando diferentes dosis de STZ y tiempo hasta DM, antes del día 5 todos los animales de dosis 75 mg/Kg o un gran porcentaje (95-100%) mueren, a dosis de 33 mg/Kg se observa diagnóstico de DM al tercer día, con glucemias oscilantes y una disminución progresiva de glucosa después del día 5, llegando a niveles inferiores a 200 mg/dl, mientras que la dosis de 50

mg/Kg mantiene la glucemia por encima de 300 mg/dl con tendencia a estabilizarse, considerándose los valores de glucosa superiores a 200 mg/dl como de DM establecida (94).

En estas condiciones de DM se han evaluado parámetros de EO, mostrándose una alteración dosis dependiente de la STZ empleada para la inducción de la DM, lo que permite establecer que empleando una dosis de 50 mg/Kg de STZ en ratas Wistar, se obtiene en los animales un cuadro de DM que afecta de forma significativa a diferentes marcadores de EO, por lo cual podría emplearse como modelo animal para estudiar la DM2 y EO (95), condiciones ideales para este trabajo.

### **1.5.2 Inducción de infarto de miocardio en modelo animal**

La aplicación de procedimientos quirúrgicos, fármacos, mutaciones genéticas espontáneas y dirigidas han permitido disponer de un gran número de modelos experimentales para el estudio de la ECV.

Dado el motivo de este estudio, detallamos el modelo de isquemia miocárdica por oclusión coronaria, lo cual permite obtener datos sobre el desarrollo del remodelado ventricular adverso tras IM.

El primer modelo de IM en ratón fue en el año 1978, por Zolotareva y Kogan, posteriormente Lloyd H. Michael describió un modelo de ligadura de la arteria coronaria descendente anterior (LAD) para la inducción de IM en ratón, en 1995. La mortalidad asociada a la inducción de IM en rata es muy variable, y va a depender de múltiples factores como edad, peso de animal, cepa y comorbilidad, siendo aún mayor en el contexto de la hiperglucemia en DM. La mortalidad depende en las primeras horas post IM del estrés asociado al procedimiento

quirúrgico, a las arritmias o al daño miocárdico establecido y entre las 24 horas y 7 días post IM, principalmente a complicaciones de la cirugía y fallo ventricular, entre otras (96).

Existen diferencias en el miocardio murino respecto al humano, como pueden ser diferencias en la matriz extracelular, en proteínas como el colágeno, potenciales de acción del cardiomiocito más breves, frecuencia cardíaca hasta 5 veces superior a la de humano, menor actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , entre otras, pero pese a ello, el modelo murino para el estudio experimental en cardiología es excelente (97).

La oclusión coronaria provoca el cese inmediato del flujo coronario y del metabolismo aeróbico en el miocardio isquémico, lo que conduce a una rápida depleción de ATP y a la acumulación de metabolitos, que da como resultado una disfunción sistólica grave en escasos segundos. En modelo murino, una duración en la oclusión coronaria que exceda los 60-90 min se considera irreversible, y los procesos de inflamación y cicatrización de la herida se aceleran. La calidad de la cirugía y de la esternotomía es determinante para inducir la oclusión coronaria e impacta directamente en los resultados del estudio. Así pues, minimizar el tamaño de la toracotomía y limitar el sangrado es de vital importancia. La oclusión coronaria permanente produce un infarto agudo con elevación del segmento ST con gran tamaño de lesión e inflamación y remodelación miocárdica a largo plazo (97).

Los primeros 1-14 días tras la ligadura coronaria se caracterizan histológicamente por necrosis con infiltrado inflamatorio en las regiones del infarto y de la zona fronteriza. El infarto se caracteriza geométrica y fisiológicamente por el adelgazamiento de la pared, aumento en las dimensiones

y volúmenes del VI y disminución en la FE y de acortamiento. Los cambios que ocurren durante la primera semana brindan información sobre la muerte celular de miocitos y el desarrollo de infarto, inflamación, recambio de la matriz extracelular y el papel de las células endoteliales en la neovascularización. La evaluación crónica a las 4-8 semanas después del IM proporciona información sobre remodelación a largo plazo (97).

La cicatrización y el remodelado de heridas cardíacas, típicamente evaluadas de días a semanas después del IM, se pueden examinar utilizando una amplia variedad de procedimientos. Entre otros, algunos de los utilizados en el estudio son la ecocardiografía, útil para definir fenotipos, cinética y características del miocardio infartado, la tinción con hematoxilina y eosina, que proporciona información sobre áreas de necrosis e inflamación, la inmunohistoquímica, proporciona información sobre el grado de inflamación, formación de cicatriz y neovascularización, el aislamiento de células individuales... Todos ellos, pueden ayudar a definir los mecanismos de interés en este estudio (97).

## **1.6 El papel de la enzima GTP ciclohidrolasa 1 en el remodelado cardíaco.**

El correcto funcionamiento del sistema endotelial depende de la síntesis de eNOS mediante la enzima NOS (98). Como hemos comentado previamente, existen 3 isoformas de NOS, eNOS, iNOS y nNOS, teniendo cada isoforma un rol en la AE. Así, eNOS y nNOS tienen un papel ateroprotector y vasodilatador, mientras que la iNOS tiene una acción principalmente proaterogénica y vasoconstrictora. La isoforma iNOS, en condiciones fisiológicas está ausente en

la vasculatura, siendo inducida su expresión en situaciones tales como inflamación, estrés o sepsis (99). Si se induce su expresión en las células endoteliales, iNOS compete con eNOS por la BH4, produciendo un descenso en la disponibilidad de BH4 y, como consecuencia, de la síntesis de eNOS. Además, la inducción de iNOS facilita la producción endotelial de peroxinitrito y nitrotirosina, ambos oxidantes aterogénicos (100). La síntesis de ON por estímulo de la eNOS muestra múltiples efectos anti ateroscleróticos, como inhibición de la oxidación de partículas de colesterol LDL, prevención de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular, migración de los leucocitos a la pared vascular e inhibición de la proliferación de las células musculares endoteliales. Sin embargo, la sobreexpresión de eNOS puede ocasionar riesgo aterogénico, por disminución de su cofactor BH4. Así, incrementos de BH4 en estas circunstancias se han asociado a una reducción del riesgo de AE (101).

Para que todo esto ocurra, es necesario el correcto acoplamiento entre eNOS y su sustrato L- Arginina, utilizando como cofactor a la BH4, pero el proceso no está ampliamente descrito (101). Bajo condiciones de EO, BH4 es transformado a BH2, promoviendo el desacoplamiento de la eNOS y la síntesis de  $O^2$ , en lugar de ON (58). BH4 es sintetizado de novo a partir del trifosfato de guanosina (GTP), por la acción secuencial de tres enzimas (GCH1, 6-pyruvyl tetrahydrobiopterin synthase y sepiapterin reductase), siendo la enzima GCH1 el paso inicial y siendo, por tanto, la enzima limitante en el proceso. Esta enzima se regula mediante retroalimentación negativa por la BH4 y de forma transcripcional regula su expresión. BH4 induce la formación de un complejo entre la GCH1 y la proteína reguladora de GCH1 (GFRP) (102).

Se han realizado estudios experimentales en los que el tratamiento con BH4 sintética o precursores de BH4 como la sepiapterina, produce tanto una disminución en los marcadores de estrés como la nitrotirosina, como una mejora de la función miocárdica. Se han llevado a cabo también modificaciones de la expresión de ARNm de GCH1 con fenilalanina o interferón alfa, para valorar su significado en la síntesis de ON, su relación con la AE, afectación miocárdica, proliferación celular... pero son necesarios más estudios que reflejen con detalle cuál es su mecanismo de acción en condiciones fisiológicas y en la patología (58,102,103). La acción mediada por GCH1 en MCD parece depender de una interrelación entre los niveles de BH4, nNOS y el  $Ca^{2+}$  en retículo sarcoplásmico. Así, una disminución en la expresión de GCH1 justifica, en parte, el daño de la MCD por aumento de la actividad 26S proteosoma, que cataliza la degradación proteica ATP-dependiente por la vía ubiquitina. Su sobreexpresión reduce el remodelado miocárdico por una mejora en la señalización del  $Ca^{2+}$  intracelular, producido por el aumento en la biodisponibilidad de BH4, el correcto acoplamiento de NOS y una disminución de la producción de EROs y AMPK (104).

## **2. JUSTIFICACIÓN**



La IC y los ECV relacionados con la AE son las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM. Los estudios clínicos a largo plazo indican que el control intensivo de la glucosa no previene los ECV e, incluso, parece que pueda aumentar la hospitalización por IC y por hipoglucemia grave.

En ensayos clínicos recientes, los i-SGLT2 han demostrado reducir significativamente el RCV, el riesgo de muerte por cualquier causa y otros eventos adversos, como las hospitalizaciones relacionadas con IC en pacientes con o sin DM (21,40,105). El ensayo DAPA-HF (105) mostró por primera vez que los fármacos i-SGLT2 son capaces de reducir la mortalidad y los eventos adversos asociados a la IC en pacientes con IC crónica e ICFER, independientemente del estado glucémico. Sin embargo, los mecanismos cardíacos que subyacen a los beneficios clínicos, en presencia de disfunción sistólica del VI e IC, así como la relación con el estado glucémico, siguen sin estar claros. Y, si el i-SGLT2 tiene un papel potencial en la limitación del remodelado ventricular posterior al IM, tampoco está bien caracterizado.

A partir de estos resultados se consideró esta diana terapéutica, no sólo para el tratamiento de la DM2, sino también en la IC con o sin DM2.

En la actualidad, gracias a los resultados de los estudios EMPEROR Reduced (106) y EMPEROR Preserved (107,108), EMPA se encuentra dentro de los protocolos de tratamiento de la IC, independientemente de la FE, tanto ICFER como ICFEP en pacientes con o sin DM.

En ambos ensayos clínicos, EMPA mostró una reducción significativa del riesgo relativo combinado de muerte por causas CV u hospitalización por IC, frente al placebo. Los resultados del criterio de valoración principal fueron similares en subgrupos con o sin DM2. Además, en el análisis de objetivos

secundarios, se mostró que EMPA redujo el riesgo relativo de la primera hospitalización y de hospitalización recurrente por IC.

En la actualidad se está desarrollando un nuevo estudio, EMPACT-MI, cuya finalidad es mostrar si la EMPA puede reducir el riesgo de IC y muerte en personas que sufrieron un IM, lo cual sería una aproximación a nuestra hipótesis de estudio trasladado del modelo animal a la clínica habitual.

A su vez, existe un interés creciente en el papel que juega la GCH1 en el remodelado cardíaco. De hecho, la presencia de déficit, inhibición o mutaciones del gen GCH1 produce HTA, hipertensión pulmonar y disfunción cardíaca. Varios estudios han determinado que GCH1 es la primera enzima limitante en la velocidad de síntesis de novo de BH4, esencial para las tres isoformas de NOS. Cuando los niveles de BH4 se vuelven limitantes, las enzimas NOS se desacoplan y se produce  $O_2^-$  como producto alternativo. Esta producción de  $O_2^-$  puede potenciar la disfunción cardíaca y la patogénesis de la MCP dilatada.

Con la evidencia disponible hasta el momento, se pretende valorar el hipotético efecto anti-remodelado de la EMPA en presencia de disfunción sistólica de VI tras un IM, su interacción con el estado glucémico y los mecanismos miocárdicos subyacentes, mediante la evaluación de la participación de GCH1 y la vía NOS. A su vez, se pretende describir los resultados obtenidos en otros parámetros metabólicos y su correlación con la evidencia científica actual.

# 3. HIPÓTESIS



La inhibición del receptor SGLT2 con una nueva diana terapéutica en DM2, la EMPA, podría ser un mecanismo terapéutico para proteger el remodelado y disfunción cardíaca producida tras un proceso isquémico agudo.

Si nuestra hipótesis barajada se cumple, se obtendría un beneficio potencial para los pacientes con DM con o sin IC asociada que hayan sufrido un proceso isquémico agudo, lo cual reduciría la morbimortalidad, el RCV y los costes sanitarios asociados a las complicaciones en esta patología de elevada prevalencia.



# 4. OBJETIVOS



## **Objetivo principal**

En relación con la hipótesis principal, el objetivo principal que se plantea con la presente tesis doctoral es investigar la influencia de la EMPA en la progresión del remodelado y función miocárdica tras la isquemia aguda.

Además, con dicho estudio científico, trataremos de establecer los mecanismos miocárdicos subyacentes, mediante la evaluación de la participación de GCH1 y la vía NOS.

## **Objetivos secundarios**

Los objetivos secundarios planteados son, en primer lugar, determinar si el beneficio del fármaco es única o predominantemente a nivel miocárdico (mediante la evaluación de la participación de GCH1 y la vía NOS).

En segundo lugar, determinar si se observa un beneficio multifactorial, como describen estudios publicados, debido a la suma de efectos en distintos niveles, tales como:

- Diuresis osmótica y natriuresis.
- Enlentecimiento en la progresión del deterioro en función renal.
- Pérdida de peso.



# 5. DISEÑO



## 5.1 Declaración de aceptación por el comité de Ética.

Los protocolos del experimento fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentos con Animales de la Universidad de Murcia (número de permiso: A13150105). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación vigente.

En este contexto, ratas Wistar machos (7-8 semanas de edad y con un peso de 250-280 gramos; ENVIGO RMS, SL (Barcelona, España)) fueron mantenidas en condiciones de control climático con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales recibieron comida estándar y agua *ad libitum*. Después de 7 días de adaptación, las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: ratas no diabéticas y diabéticas.

## 5.2 Diseño experimental y protocolo de estudio.

Para evaluar las diferencias en el efecto de la terapia EMPA (Jardiance<sup>®</sup>) sobre el IM con o sin DM, el análisis se realizó sobre ocho grupos experimentales (Figura 10.a):

- Grupo 1: ratas no infartadas y no diabéticas que recibieron tampón fosfato salino (PBS) durante 54 días.
- Grupo 2: ratas infartadas no diabéticas que recibieron PBS durante 54 días.
- Grupo 3: ratas no infartadas y no diabéticas que recibieron EMPA (10 mg/kg/d) durante días.
- Grupo 4: ratas infartadas no diabéticas que recibieron EMPA (10 mg/kg/d) durante 54 días.
- Grupo 5: ratas no infartadas y diabéticas (STZ) que recibieron PBS durante 54 días.
- Grupo 6: ratas infartadas diabéticas (STZ) que recibieron PBS durante 54 días.
- Grupo 7: ratas no infartadas y diabéticas (STZ) que recibieron EMPA (10 mg/kg/d) durante 54 días.
- Grupo 8: ratas infartadas y diabéticas (STZ) que recibieron EMPA (10 mg/kg/d) durante 54 días.

En esta figura, se muestra un esquema representativo del protocolo experimental que se utilizó en el estudio.

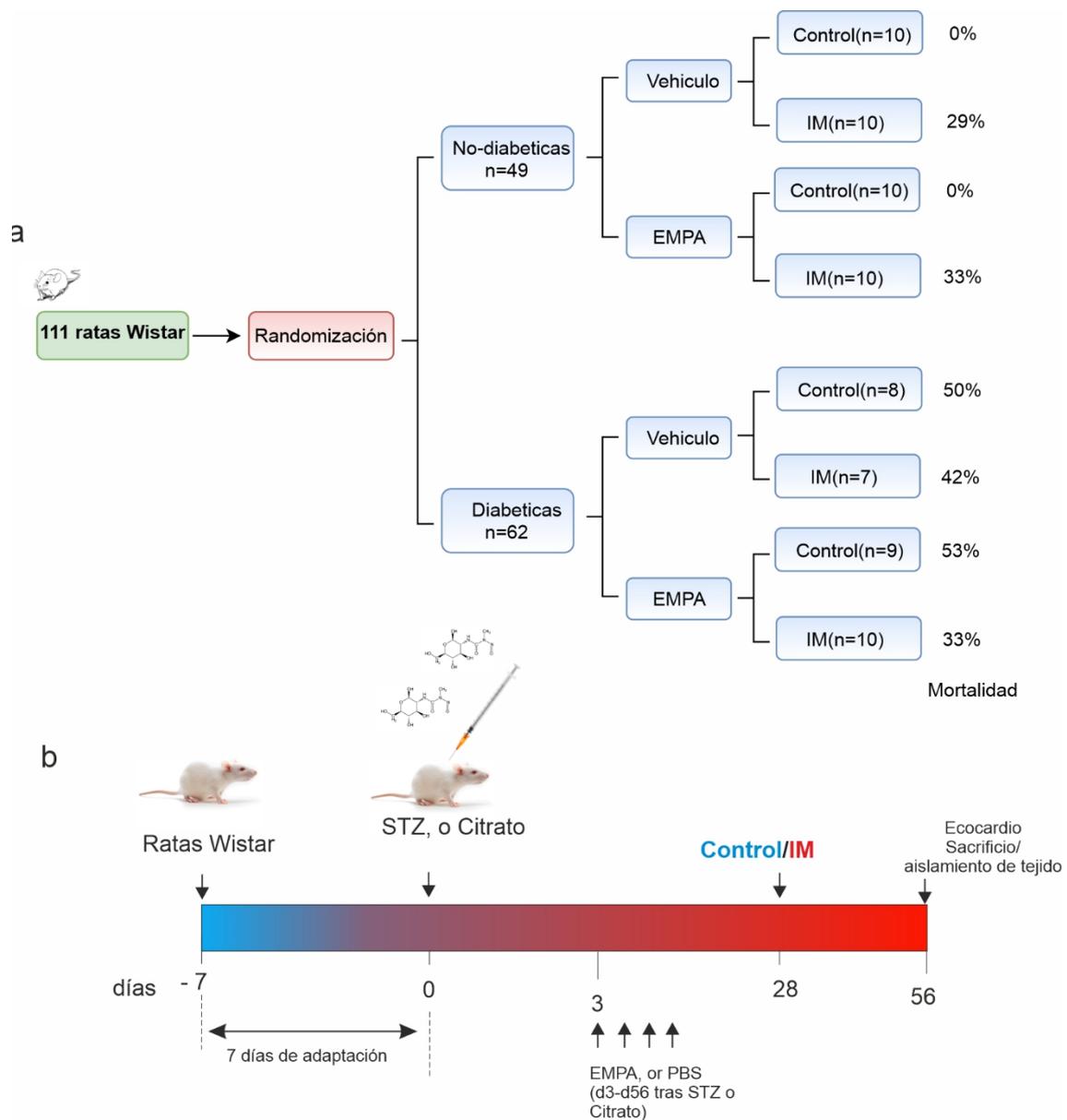


Figura 10. Diseño experimental. (a) Diagrama de flujo del estudio. (b) Esquema representativo del diseño experimental; el intervalo de tiempo donde las ratas fueron tratadas con EMPA se muestra en rojo. EMPA: empagliflozina; MI: infarto de miocardio; STZ: estreptozotocina, d: días.

Las ratas diabéticas y las no diabéticas se asignaron al azar al tratamiento con agua en presencia o en ausencia de EMPA (10 mg/kg/d), respectivamente. La dosis de fármaco se recalculó cada 2 días en base a la cantidad de agua

ingerida y el peso corporal. El tratamiento con EMPA se mantuvo 4 semanas antes de la inducción del IM y se prolongó durante otras 4 semanas, antes del sacrificio de los animales (Figura 10.b), hasta las 8 semanas de tratamiento.

### **5.3 Drogas y productos químicos.**

Las drogas y productos químicos que fueron utilizados para el experimento fueron los siguientes:

La EMPA, iSGLT2, se adquirió de Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, CT, EE. UU. (Jardiance®).

La STZ (S0130), citrato de sodio (71402) y otros productos químicos de grado analítico se adquirieron de Merck (Merck, EE. UU.).



# **6. MODELO EXPERIMENTAL**



## **6.1 Modelo diabético inducido por STZ.**

La DM se indujo mediante una única inyección intraperitoneal de STZ (55 mg/kg), disuelta en tampón citrato pH 4,5 (109). De forma paralela, se generó un grupo control no diabético (n=49), en el que se trató a los animales con tampón citrato (0.1 M, pH 4,5) en ausencia de STZ.

Para prevenir la aparición de hipoglucemia, los animales (n=62) fueron tratados con glucosa 5% en el agua de bebida, durante las primeras 24 horas tras la administración de STZ.

Tres días después de la inyección de STZ, los animales fueron consideradas diabéticos y seleccionados para el estudio si presentaban niveles de glucosa en sangre venosa, obtenida de la vena de la cola, superiores a 300 mg/dl. Las medidas de glucemia fueron realizadas mediante un glucómetro, tras desecharse la primera gota de sangre. (Modelo NC, ref., 06870333001).

## **6.2 Inducción de infarto de miocardio**

Cuatro semanas después de iniciar la terapia con EMPA, se evaluaron los niveles de glucosa en sangre y las ratas se agruparon al azar en un grupo con ligadura permanente de la arteria coronaria anterior descendente izquierda (LAD) o en un grupo control donde los animales fueron sometidos al mismo protocolo de cirugía, pero sin proceder a la ligación de la arteria.

Previo a los procedimientos quirúrgicos, los animales fueron anestesiados con isoflurano (2.5%), mediante la inserción de un catéter intravenoso de calibre 16 y colocados en posición supina sobre una almohadilla de control de temperatura. Posteriormente fueron intubados, ventilados y monitorizados

mediante electrocardiograma (ECG), con electrodos conectados a las extremidades a través de pequeñas agujas insertadas por vía subcutánea.

La toracotomía izquierda se realizó mediante una pequeña incisión entre el tercer y cuarto espacio intercostal. La incisión se expandió mediante un retractor de extremos romos, de tal manera que se evitaron los pulmones en el área de retracción. El saco pericárdico que rodea el corazón se abrió, pero el corazón no se exteriorizó. El sitio de la LAD se determinó a 8 mm de distancia de su origen. Usando una aguja atraumática cónica, se pasó una ligadura de seda 6-0 debajo del LAD y se ató con tres nudos. El blanqueo visible y la cianosis de la pared anterior del VI y la inflamación de la aurícula izquierda (AI) se tomaron como indicativos de una correcta ligadura. El procedimiento se consideró exitoso si el ECG mostraba elevación del segmento ST y la pared anterior del VI se blanqueaba.

Las costillas y los músculos se cerraron usando suturas de 6-0 solubles, y dejando un pequeño espacio para aspirar el aire que quedaba en la cavidad torácica mediante un tubo interno (2 mm de diámetro), sin tocar los pulmones.

El sitio quirúrgico se revisó diariamente para evitar cualquier infección y para controlar posibles dehiscencias del sitio de sutura.

Todo el procedimiento se realizó en un período de 20 minutos tras la inducción de la anestesia. Un grupo de animales, considerado control no infartado, fue sometido al mismo procedimiento quirúrgico, pero sin proceder a la ligación de la coronaria. Después de la cirugía, los animales recibieron cuatro dosis de buprenorfina (0.05 mg/kg, subcutáneo) a intervalos de 8 horas.

# **7. RECOGIDA DE DATOS Y VARIABLES**



### **7.1 Ingesta de alimentos y agua. Recolección de sangre y orina.**

Al inicio del estudio (en el punto previo a la administración de STZ/citrato), 3 días después de la administración STZ/citrato (inicio del tratamiento con EMPA), así como 7 días, 4 y 8 semanas después del inicio del tratamiento con EMPA, las ratas se pesaron y se colocaron individualmente en jaulas metabólicas para las mediciones de 24 horas de ingesta de alimentos y agua, y recolección de orina. Las ratas se aclimataron a las jaulas metabólicas colocándolas a dos períodos de luz diurna, previamente a la recolección de 24 horas.

Se recogieron muestras de sangre de la cola inmediatamente después de la extracción de las jaulas metabólicas. El plasma y la orina fueron almacenados a -80 °C para su posterior análisis.

La glucosa en plasma y en orina y la creatinina en orina se determinaron enzimáticamente con el sistema Roche/Hitachi Cobas (Roche Alemania). El sodio y el potasio en plasma y orina se midieron por métodos de electrodos selectivos de iones con el sistema Roche/Hitachi Cobas (Roche Alemania).

### **7.2 Ecocardiografía**

Todas las ratas se sometieron a un examen ecocardiográfico 24 horas y 4 semanas después de la inducción de IM (justo antes del sacrificio), utilizando un sistema de ultrasonido digital comercial (HD11 XE Philips, Andover, Massachusetts, EE. UU.), equipado con un transductor de sector de matriz en fase de 4-12 MHz.

El procedimiento ecocardiográfico fue realizado por un investigador capacitado y a ciegas, siguiendo el protocolo del Comité de Ecocardiografía de

la Especialidad de Cardiología del Colegio Americano de Medicina Interna Veterinaria y las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía. Antes de los procedimientos ecocardiográficos, los animales fueron anestesiados con ketamina (75 mg/kg, intraperitoneal) y medetomidina (0,5 mg/kg, intraperitoneal).

Se obtuvieron imágenes estándar ecocardiográficas 2D del VI tanto en el eje largo como en el corto. Mediante la ecocardiografía 2D, los signos de IM se definieron como cualquier segmento con mayor ecogenicidad y/o cambio en el engrosamiento miocárdico o del movimiento sistólico (hipocinesia, acinesia o discinesia). A partir de las vistas del eje largo de cuatro cámaras, los volúmenes ventricular izquierdo sistólico (LVESV) y ventricular diastólico izquierdo (LVEDV) se determinaron mediante el método Simpson y la FE se determinó automáticamente como  $FE = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} \times 100$ . A nivel de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral, las mediciones de dimensión ventricular izquierda-diastólica final (LVEDD) y sistólica final (LVESD) se realizaron mediante el modo M. Los parámetros se enumeran en la Tabla anexo 1.

### **7.3 Muestras de tejido e histología.**

Tras cuatro semanas de IM, los animales fueron sacrificados y sus corazones se mantuvieron en diástole mediante la administración intravenosa con 0,2 ml de cloruro de potasio al 10% (MERCK). A continuación, el corazón fue extraído y posteriormente lavado con DPBS frío antes de separar y aislar para su análisis el ventrículo izquierdo (VI).

Para el análisis histológico, secciones del VI de siete animales de cada grupo experimental se fijaron en formaldehído al 4%, 24 horas antes de la

inclusión en parafina. La tinción tricrómica de Masson se utilizó para evaluar el tamaño del infarto y la extensión de la fibrosis. Para la medición del tamaño del infarto, se usó el aumento del depósito de colágeno (azul), para definir la región del VI dañada.

Las secciones se evaluaron con microscopio óptico (Nikon eclipse 80i) y las imágenes se digitalizaron. El tamaño del infarto se calculó como porcentaje de la longitud de la cicatriz con respecto a la circunferencia total del VI, en la sección teñida con tricrómico de Masson. Además, en el área del borde de cada muestra se analizó la fibrosis cardíaca. Para su cuantificación, se tomaron al menos seis imágenes aleatorias de cada portaobjetos con un aumento de 20x y se utilizó el depósito resaltado de colágeno (azul) para definir la fibrosis. El porcentaje de circunferencia de la cicatriz se determinó como la circunferencia total del infarto dividida por la circunferencia total del VI  $\times 100$ .

Para realizar otros estudios moleculares de células biológicas, (extracción de ARN y la transferencia Western), el área peri-infarto se recogió al menos a 5 mm del borde del área del infarto y se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Los técnicos/observadores que realizaron las imágenes o los estudios moleculares celulares, estaban cegados al protocolo del estudio.



# **8. ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DE DATOS**



## 8.1 Ensayos *in vitro*.

Se utilizaron cardiomiocitos adultos aislados de ratones C57BL6/J39 para determinar si el efecto cardioprotector relacionado a la terapia EMPA pudiera ser debido a una regulación positiva de GCH1. Se evaluaron los niveles de ARN mensajero (ARNm) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) cuantitativa, para troponina T cardíaca (c-TnT), cadena pesada de miosina  $\beta$ -cardíaca ( $\beta$ -MHC) y  $\alpha$ -actinina, como marcadores específicos de cardiomiocitos (figura 11).

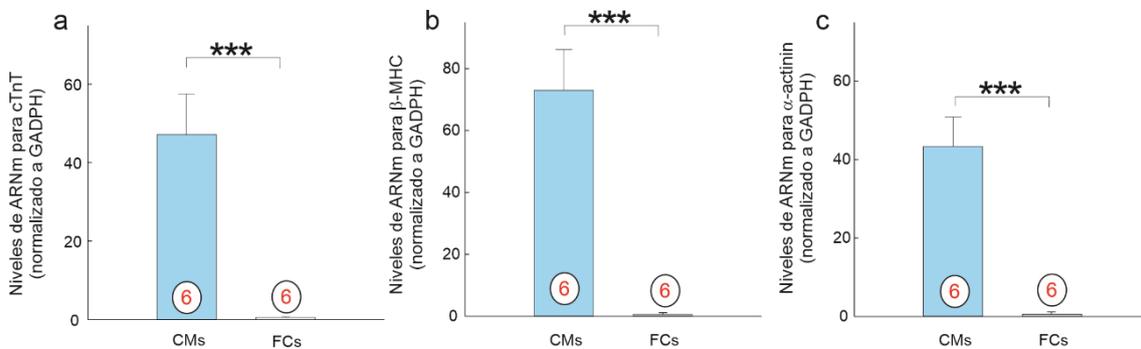


Figura 11. Pureza de los cardiomiocitos primarios. (a-c) Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de c-TnT,  $\beta$ -MHC y  $\alpha$ -actinina de miocitos cardíacos (CM) y fibroblastos (CF) del corazón de C57BL6 / J. Los números rojos representan cuántos experimentos independientes se realizaron por grupo (n = 6). \*\*\* p < 0,001 frente a fibroblastos cardíacos. c-TnT: troponina T cardíaca;  $\beta$ -MHC: cadena pesada de miosina  $\beta$ -cardíaca.

Los ensayos se realizaron en ausencia de suero. El estiramiento biomecánico se realizó utilizando una adaptación del diseño experimental establecido en estudios previos (110,111). Para recrear el entorno químico de la DM y comprender el papel específico de GCH1 en la mitigación del remodelado adverso y antes de inducir la tensión biomecánica, se cultivaron los cardiomiocitos durante 48 horas en un medio que contenía glucosa 30 mM, situación de hiperglucemia, en contraste con la concentración estándar de glucosa, 5.5 mM. Posteriormente, las células se sometieron a tensión biomecánica durante 15 horas, siguiendo el protocolo experimental. Para excluir

un efecto hiperosmolar, agregamos concentraciones idénticas de manitol (30 mM; MERCK, cat # M4125) en los cultivos de control.

Finalmente, los cultivos monocapa se lavaron con DPBS y las células se eliminaron y procesaron para la extracción de ARN y proteínas siguiendo el protocolo (112). Las células se incubaron con EMPA (500 nM), 30 minutos antes de la adición de D-glucosa, adquirido de MERCK (AMBH324A493F AMBEED, INC). El protocolo experimental para silenciar la expresión endógena de GCH1 se detalla más adelante (véase apartado 9.3. Silenciamiento de GCH1 por ARN de interferencia).

## **8.2 Ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real.**

El ARN total se aisló tanto del área del borde del VI infartado como de cardiomiocitos bajo estiramiento biomecánico. El ARN se purificó con el Kit RNeasy Mini (Qiagen), y el ADN complementario (ADNc) se preparó con el kit de síntesis de ADNc iScript (BIORAD LAB. INC., Madrid), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

La PCR cuantitativa se realizó usando una mezcla de TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (TAKARA BIO INC., Europa), junto con los cebadores de interés (MERCK). Las secuencias empleadas para el estudio de los niveles de ARNm específicos para diversos genes, se muestran en la tabla 2.

Gen	Cebador Forward primer (5'→3')	Cebador Reverse primer (5'→3')
Col1a1	CATG TTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
Col3a1	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTA	CAGAGGTGCCATCCAGAGTT
GCH1	CCAGGTGCAGCAATGGGTTC	TTCAACCACTACCCCGACTC
Myh6	GCCCAGTACCTCCGAAAGTC	GCCTTAACATACTCCTCCTTGTC
Myh7	ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA	TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG
Nppa	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	GGGGGCATGACCTCATCTT

*Tabla 2. Secuencias de cebadores de genes específicos utilizados para PCR cuantitativa en tiempo real. Col, colágeno; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GCH1, ciclohidrolasa GTP cardíaca 1; Myh, cadena pesada de miosina; Nppa, precursor de péptido natriurético A.*

### 8.3 Análisis Western Blot.

Las muestras del VI de la zona peri-infarto o procedentes de extractos celulares, tratadas o sin tratar, fueron lavadas y posteriormente lisadas usando el tampón de lisis celular RIPA (THERMOFISHER, EE. UU.) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatas (MERCK, EE. UU.).

La proteína total fue extraída y su concentración se cuantificó mediante el método del BCA (113). Extractos de proteína (35 µg) fueron desnaturalizados y separados mediante electroforesis SDS-PAGE y posteriormente transferidos a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (MERCK MILLIPORE, EE. UU.). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas utilizando albúmina de suero bovino al 5% (BSA) en una mezcla de solución salina tamponada con tris (TBST) y se incubaron con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos utilizados están resumidos en la Tabla 3.

Molécula	Dilución	Fuente	Referencia
GCH1	1:500	Abcam	ab236387
Fosfo-enos(Ser1177)	1:1000	Cell Signaling	9570
eNOS	1.500	Cell Signaling	9572
Fosfo-nNOS(Ser1417)	1:1000	Abcam	ab90443
nNOS	1:500	Cell Signaling	4234
iNOS	1:1000	R&D Systems	MAB9502
GADPH	1:5000	Merck	G8795

*Tabla 3. Resumen de los Anticuerpos utilizados en el estudio.*

Las bandas se visualizaron usando el reactivo ECL-plus (Reactivo de detección de transferencia Western Primer de AMERSHAM ECLTM (GE HEALTHCARE, NJ, EE. UU.) (RPN2232)), utilizando un sistema ChemiDoc XRS + con software Image Lab de BIO-RAD LABORATORIES (Berkeley, CA, EE. UU.).

#### **8.4 Inmunohistoquímica**

Se obtuvo la porción media del músculo papilar del VI y se fijó con formalina (disolución de formaldehído y agua; 1:1), antes de ser embebida en parafina, (3 µm) y colocada posteriormente en un portaobjetos de vidrio recubierto con poli-L-lisina. Las secciones se desparafinaron y pretrataron en Dako PT Link durante 20 minutos a 97 °C, utilizando la solución de recuperación de objetivos EnVision FLEX, pH alto (Dako, Dinamarca).

Para la tinción de GCH1, las secciones rehidratadas se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo policlonal contra GCH1 (dilución de trabajo 1: 500, Proteintech, Chicago, IL, EE. UU.). Después, las secciones se incubaron

con un polímero marcado con biotina y conjugado con un anticuerpo secundario (Dako EnVision), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Finalmente, las secciones se revelaron con 2-2´diaminobencidina (DAB) y se obtuvieron imágenes de alta resolución a través de un microscopio de barrido invertido Leica SP8 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania).

Se tomaron seis imágenes aleatorias de cada portaobjetos con un aumento de 10x (n = 7 cortes/cada grupo tratado) y se identificó una inmunotinción positiva como un precipitado citoplasmático de color marrón oscuro.

## **8.5 Análisis estadístico.**

Para determinar las diferencias en la mortalidad, de acuerdo con las recomendaciones de Cochran, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Los datos obtenidos se representaron como media  $\pm$  S.E.M., utilizando gráficos de barras con barras de error. Las diferencias estadísticas se evaluaron ajustando modelos lineales con interacciones (determinadas por ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post hoc de Bonferroni) y estimando medias marginales. Se usó corrección de Holm para comparaciones múltiples. El valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo. Con el objetivo de hacer comparaciones más complejas, se ajustaron regresiones lineales bayesianas con interacciones en todos los casos.

Para evaluar el efecto de EMPA, se calcularon las diferencias entre los grupos tratados y los controles. Para comparar los aumentos o disminuciones de promedios entre grupos, se calcularon las diferencias-de-diferencias.

Finalmente, con el propósito de evaluar si el beneficio de EMPA es mayor en presencia de diabetes en los grupos infartados, también se han calculado

aumentos porcentuales relativos. Estos porcentajes se han promediado para obtener una estimación general por grupos funcionales (hipertrofia y fibrosis). La media, el intervalo bayesiano al 95% (BCI) y la probabilidad posterior de ser positivo (PP),  $P(\mu > 0 | \text{datos})$  o negativo (PN),  $P(\mu < 0 | \text{datos})$ , se estimaron para cada variable.

Para extraer muestras de la distribución posterior, se utilizaron 4 cadenas de Markov Hamiltoniano de Monte Carlo, con 1000 interacciones de calentamiento y 1000 interacciones de muestreo cada una. En todos los casos se utilizaron distribuciones previas normales débilmente informativas por defecto. La convergencia se diagnosticó con traceplots, tamaños de muestras efectivos y Rhats. Todos los análisis se realizaron con R v.3.6.0 y Stan v.2.18 con las interfaces rstan y rstanarm.

# **9. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES PARA EL ANÁLISIS DE DATOS**



## 9.1 Aislamiento de células primarias de ratones adultos.

Se recogieron los corazones y se perfundieron brevemente de forma retrógrada las arterias coronarias, antes de su extracción, con tampón A (NaCl 113 mM, KCl 4,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,6 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  12 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM, HEPES 10 mM y taurina 30 mM), mediante canulación de la aorta. Se añadió colagenasa tipo II (Worthington, Lakewood, N.J.) para disociar enzimáticamente las células ventriculares.

Las células se dejaron sedimentar a 37 °C durante 10 minutos para permitir que los cardiomiocitos quedaran como un granulado, dejando atrás el sobrenadante. Los cardiomiocitos se volvieron a suspender en el tampón B (47,5 ml de tampón A, 2,5 ml de suero bovino fetal (FCS) y 62,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  10 mM). Se añadió  $\text{CaCl}_2$  gradualmente a las células hasta una concentración final de 100 mM, y los cardiomiocitos aislados se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM) que contenía FCS al 5% (v/v) (porcentaje volumen/volumen (% V/V), se refiere al volumen de soluto por cada 100 unidades de volumen de la solución), 2,3-butanodionamonoxima 10 mM, L-glutamina 2 mM y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina durante 2 horas a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

## 9.2 Modelo de estiramiento biomecánico.

Para inducir la tensión biomecánica se siguieron los protocolos experimentales descritos por Banerjee y col., con algunas modificaciones (111). Los cardiomiocitos primarios se cultivaron en placas de cultivo Flex I de seis pocillos (BF-3001C Flexcell International, EE. UU.) recubiertas con Col I. Todos los ensayos se realizaron en ausencia de suero. El estiramiento biomecánico se realizó utilizando un sistema de tensión Flexcell FX-5000 (Flexcell International,

McKeesport, PA). Este dispositivo utiliza un vacío controlado para deformar la monocapa de células que crecen en la parte superior de la membrana. En este caso, el vacío produjo un alargamiento del 16% en las membranas de elastómero del fondo flexible a una frecuencia de 60 ciclos/minuto (1 Hz) durante 15 horas. Las células control también se colocaron en placas Bioflex para evitar variaciones basadas en el estado de unión y condiciones estáticas. Los modelos de desmontaje se realizaron antes de la inducción de deformación. En este caso, las células se mantuvieron 48 horas en un medio que contenía suero para aumentar la flexibilidad de las células a las condiciones experimentales.

### **9.3 Silenciamiento de GCH1 por ARN de interferencia.**

El ARN de interferencia (siARN) específico para GCH1 o el siARN control (Dharmacon, Lafayette, CO) se transfirieron a los cardiomiocitos usando Lipofectamine 3000 (la concentración de transfección fue de 20 nM), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó una mezcla de cuatro siARNs específicamente diseñados para silenciar la expresión de GCH1 (114). La efectividad del silenciamiento se muestra en la Figura 17. Brevemente, las células ( $\sim 20 \times 10^3$ ) se colocaron en una placa de seis pocillos y se cultivaron a 37°C en medio completo durante 2 días. Posteriormente, las células se sometieron a transfección usando Lipofectamin 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 8 horas. A continuación, se adicionó medio completo que contenía suero y el tiempo de incubación se prolongó otras 24 horas. Posteriormente, las células transfectadas se lavaron dos veces con DPBS a 37 °C antes de la inducción de la tensión biomecánica.

Para estudiar el efecto de BH4, los cardiomiocitos adultos que carecen de proteína GCH1 endógena fueron tratados con BH4 200  $\mu$ M durante 2 horas, antes del estiramiento biomecánico de inducción en presencia de EMPA.

#### **9.4 Tamaño de cardiomiocitos y ensayo de incorporación de [3H] -leucina.**

Para medir el tamaño de los cardiomiocitos, se calculó el área de superficie de las células usando el software ImageJ, seleccionando cardiomiocitos (~ 20 células) de los campos seleccionados al azar (n = 5/experimento). Para evaluar el efecto de la incorporación de [3H] -Leucina, las células se trataron con 1,0  $\mu$ Ci/ml [3H] -Leucina (PerkinElmer) durante 24 horas, se lavaron y se fijaron con tricloroacetato al 10% durante 45 minutos a 4 °C. Posteriormente, la radioactividad se determinó por recuento de centelleo líquido (Beckman Coulter).

#### **9.5 Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa.**

El tejido fresco de la zona fronteriza (~ 30 mg) o las células en cultivo se lavaron con DPBS frío. Las células sedimentaron por centrifugación a 480 xg (fuerza centrífuga 480 veces mayor a fuerza gravitacional) durante 10 minutos a 4 °C, mientras que las muestras de tejido se colocaron en una placa Petri de vidrio previamente enfriada y se cortaron en un baño de hielo con unas tijeras afiladas. El ARN total se aisló tanto del área del borde de las muestras de tejido miocárdico como de los cardiomiocitos bajo estiramiento. El ARN se purificó con el RNeasy Mini Kit (Quiagen), y el ADNc se preparó con el kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad Lab. Inc., Madrid) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) se realizó usando TB Green

Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio Inc., Europa). Los genes amplificados y las secuencias de cebadores se han mostrado en el apartado anterior, en la Tabla 2.

## 9.6 **Fracción proteica.**

En cámara fría (4 °C), el tejido de VI (~ 30 mg) de la zona peri-infarto o las células recogidas no tratadas o tratadas (~ 8 x 10<sup>6</sup> células), se lavaron usando DPBS frío y se homogeneizaron suavemente en tampón de lisis para la sonicación y posteriormente se centrifugaron a 20.000 xg a 4 ° C, durante 20 minutos. El tampón de lisis estaba compuesto por Tris-HCl 150 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), desoxicolato de sodio al 1% (p/v), solución de sulfato de dodecilo sódico (SDS) al 0.1% (p/v), pH 8,0, junto con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa diluido 100 veces. El sobrenadante resultante se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C. Las concentraciones de proteínas se determinaron por el método del ácido bicinonínico.

## 9.7 **Western blot.**

La separación y detección de proteínas se realizó mediante procedimientos estándar, como se describió en su correspondiente apartado previamente. Las alícuotas de proteína soluble se hirvieron inicialmente durante 6 minutos en tampón de carga de gel SDS, y después, cantidades iguales de proteína se colocaron en geles de poliacrilamida SDS al 8% o 10% y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF, utilizando un sistema de transferencia húmedo de Bio-Rad en presencia de metanol a 100 V durante 1 hora y a 4 °C.

Para evaluar las proteínas de alto peso molecular (isoformas NOS), el protocolo de transferencia fue modificado a toda la noche a 25 V, en ausencia de metanol y a 4 °C (112). Las membranas se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 5% (p/v) en TBST (NaCl 137 mM, Tris 20 mM y Tween-20 al 0.1% (v/v), pH 7,6), seguido de una incubación durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo. Los anticuerpos primarios y sus diluciones, fuentes y referencias se resumen en la Tabla 3.

De la misma manera, se realizó con el anticuerpo GADPH; marcador de la fracción citosólica. Las membranas se lavaron cuatro veces durante 10 minutos cada una con TBST y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios apropiados (IgG de ratón ECL, Ac completo unido a HRP (NXA931) o IgG de conejo ECL, Ac completo unido a HRP (NA934) de Amersham BioSciences, diluido en tampón de bloqueo a 1: 10,000). Después, las membranas se lavaron cuatro veces durante 10 minutos cada una con TBST y se detectaron las bandas inmunorreactivas mediante ECL (Reactivo de detección de transferencia Western ECL<sup>TM</sup> de Amersham (GE Healthcare, NJ, EE. UU.) (RPN2232), utilizando un sistema ChemiDoc XRS + con el software Image Lab de Bio-Rad Laboratories (Berkeley, CA, EE. UU.). Se realizó un análisis cuantitativo con el software Gel-Pro Analyzer 3.1 (Sigma). Se utilizaron como marcadores de proteína, See Blue <sup>TM</sup> Plus2 Prestained (LC5925) de Life technologies o Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Dual Color Standards de BioRad (1610374).

## 9.8 Protocolo de reevaluación de la transferencia Western.

Tras el revelado, las membranas se lavaron cuatro veces durante 5 minutos usando TBST y se incubaron durante 30 minutos a 50 °C en tampón de separación (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% (p/v) SDS y 700 µl de β-mercaptoetanol, en agitación. A continuación, las membranas se lavaron seis veces durante 5 minutos usando TBST antes del bloqueo.

## 9.9 Ensayo de actividad de GCH1.

La actividad de GCH1 se determinó como se describió previamente en su correspondiente apartado, con algunas modificaciones (115). En primer lugar, en una cámara fría (4 °C), se homogeneizó el tejido fresco de la zona fronteriza de VI (~ 25 mg) o las células cosechadas no tratadas o tratadas (~ 10 x 10<sup>6</sup> células) en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, que contiene MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 0,1 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0,2 mM recién agregado y 1,0 µg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina. Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de las muestras durante 15 minutos a 4 °C a 12,000 xg se transfirieron a un tubo limpio preenfriado y se centrifugaron durante 45 minutos adicionales a 15.000 xg. Se añadió una alícuota de 300 µl del sobrenadante a 300 µl de tampón de reacción Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contenía KCl 0,3 M y EDTA 2,5 mM; que contiene 2.5 mM de GTP recién agregado, 1 mg/ml de BSA y 2.5 mM de DTT. Finalmente, la reacción se detuvo agregando 3 µl de HCl 5N en dos momentos, a las 0, 1 y 2 horas. La oxidación del producto de reacción 7,8-dihidroneopterina trifosfato a neopterina trifosfato se realizó a temperatura ambiente mediante la adición de 15 µL de solución oxidante (0,04 g% de yodo y 0,08 g% de yoduro de potasio en HCl 1 N) y se incubó durante 60 minutos. El exceso de reactivo I<sub>2</sub>/KI sin

reaccionar se eliminó mediante la adición de 2 µl de solución de ácido ascórbico al 20%. Para eliminar los grupos fosfato del trifosfato de neopterina, el pH de las muestras se ajustó a 9-10 y se incubó con solución de fosfatasa alcalina 5U (Merck (A2356)) a 37 °C durante 60 minutos. Las muestras se limpiaron por filtración a través de filtros (10K M.W.C.O Millipore, Bedford, Massachusetts), se cargaron en una columna Kinetex C18 (100 mm × 4,6 mm 2,6 µm, Phenomenex) y se eluyeron con TFA al 0,05% 0,7 ml/minuto.

Se detectó D-neopterina por fluorescencia usando una excitación de 350 nm y una emisión de 440 nm. Los estándares se utilizaron para la cuantificación y las concentraciones se normalizaron al contenido de proteínas de las muestras. La concentración de proteína de cada muestra se midió utilizando el método BCA13.

#### **9.10 Inmunofluorescencia cardíaca GCH1.**

Las células ( $\sim 4 \times 10^5$ ) se sembraron en placas con fondo de vidrio de 35 mm y se cultivaron a 37 °C en medio completo durante 2 días. Las células adheridas se lavaron 2 veces con DPBS precalentado, antes de inducir estiramiento biomecánico. Las células tratadas y no tratadas se fijaron con formaldehído al 4% (p/v) (15 minutos, RT), se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (5 minutos, RT) y se trataron con el kit potenciador de señal. iT<sup>™</sup> FX de acuerdo con el protocolo Molecular Probes (30 minutos, RT). Las células se expusieron durante la noche a 4 °C a anti-GCH1 (1:100, dilución). Al día siguiente, se incubaron con IgG anti-rata de conejo conjugada con Alexa Flúor 488 (dilución 1: 200) durante 1 hora a 37 °C. Las células marcadas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia invertida DM IRE II de Leica Microsystems

utilizando el objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO 63x con apertura numérica 1,32. Alexa Fluor 488 se estimuló con un haz láser de iones de argón. El rango correspondiente de longitud de onda de emisión fue de 508-550 nm. Las imágenes confocales se recopilaron con el módulo de cabezal de exploración Leica TCS SP2. La apertura del agujero se ajustó a 140  $\mu\text{m}$ , equivalente a un plano z de 1.1  $\mu\text{m}$  de espesor.

#### **9.11 Medición de los niveles de BH4.**

Los niveles de BH4 se midieron en el tejido homogeneizado del área del borde del VI o en muestras celulares mediante HPLC con detección electroquímica (sistema ESA Biosciences CoulArray® Modelo 542, Chelmsford, MA, EE. UU.). Se usó BH4 (10-100 nM) como estándar, y las concentraciones de la muestra se normalizaron al contenido de proteína total.

#### **9.12 Niveles totales de óxido nítrico y superóxido.**

La concentración de ON en extractos de tejido y extracto celular se determinó usando el kit de ensayo de óxido nítrico QuantiChrom (BioAssay Systems, Hayward, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorción de luz se midió a 540 nm con el uso del espectrofotómetro de microplacas SpectraMAX 190 (GMI Co., EE. UU.). Los datos se expresan en relación con una curva estándar para ON. La lucigenina, un compuesto que emite luz al interactuar con  $\text{O}_2^-$  se usó para cuantificar la producción de  $\text{O}_2^-$  a partir de muestras celulares y de tejido. Los datos se presentaron en unidades de luz relativas por milígramo de proteína.

### **9.13 Protocolo de ensayo de 3-nitrotirosina.**

La concentración de 3-nitrotirosina (3-NT) se midió utilizando el kit OxiSelect Nitrotyrosine ELISA (STA-305, Cell Biolabs). Todos los reactivos se prepararon y el protocolo se ejecutó según las instrucciones del kit. Las muestras tenían su absorbancia leída a 450 nm por un lector de placas BioTek ELx800 usando el software Gen5. Este ensayo utilizó la unión competitiva que resultó en una curva estándar inversa. Al analizar los datos, en la curva estándar se trazó en un eje x logarítmico y se utilizó una línea de tendencia logarítmica. La ecuación para la línea de tendencia se usó para calcular la concentración de 3-NT, [3-NT], respectiva de cada muestra. Cada [3-NT] se dividió por el contenido total de proteínas.



# **10. RESULTADOS**



## 10.1 Grupos experimentales

Cuarenta y nueve ratas no diabéticas y sesenta y dos ratas diabéticas fueron aleatorizadas consecutivamente a terapia con placebo o EMPA y cirugía simulada o IM, según se muestra en la Figura 10 del protocolo de estudio.

La mortalidad relacionada con el procedimiento fue similar en todos los grupos infartados, independientemente del estado de la DM o del tratamiento con EMPA ( $p = 0,69$ ). No se observó mortalidad durante las etapas posteriores del estudio y no se observó mortalidad en ratas operadas de forma simulada durante todo el estudio.

## 10.2 Efectos sobre la función cardíaca y el remodelado miocárdico

La evolución del tejido cardíaco, en función de la cicatrización, se muestra en la figura 12.a. La terapia EMPA se asoció con un menor peso cardíaco en DM (dif: -9.71 [-11.02, -8.37],  $P > 0.999$ ) y animales no DM (dif: -4.56 [-5.74, -3.34],  $P > 0.999$ ) (Figura 12.b). Después del IM, la terapia EMPA mejoró el cambio fraccional de área en ecocardiografía, en animales no DM (dif: 8.46 [5.01, 11.94],  $P > 0.999$ ) y DM (dif: 11.98 [7.98, 15.9],  $P > 0.999$ ) (Figura 12.c).

La magnitud de la mejora del cambio fraccional de área en ecocardiografía no difirió entre los animales DM y no DM (diff-in-diff: -0.45 [-2.72, 3.87]). Se encontraron resultados cardioprotectores similares cuando analizamos el efecto de la terapia EMPA en otros parámetros ecocardiográficos (Tabla anexo 1-3), incluida la FE (Figura 12.d).

Además, el tamaño del infarto del VI fue similar en los animales DM frente a los no DM (40% frente a 38%) y la terapia EMPA se asoció con un menor

tamaño del IM (Figura 12, paneles e-f) en ambos grupos no DM (dif: -14.81 [-17.11, -12.49],  $P > 0.999$ ) y DM (dif: -16.17 [-18.89, -13.58],  $P > 0.999$ ).

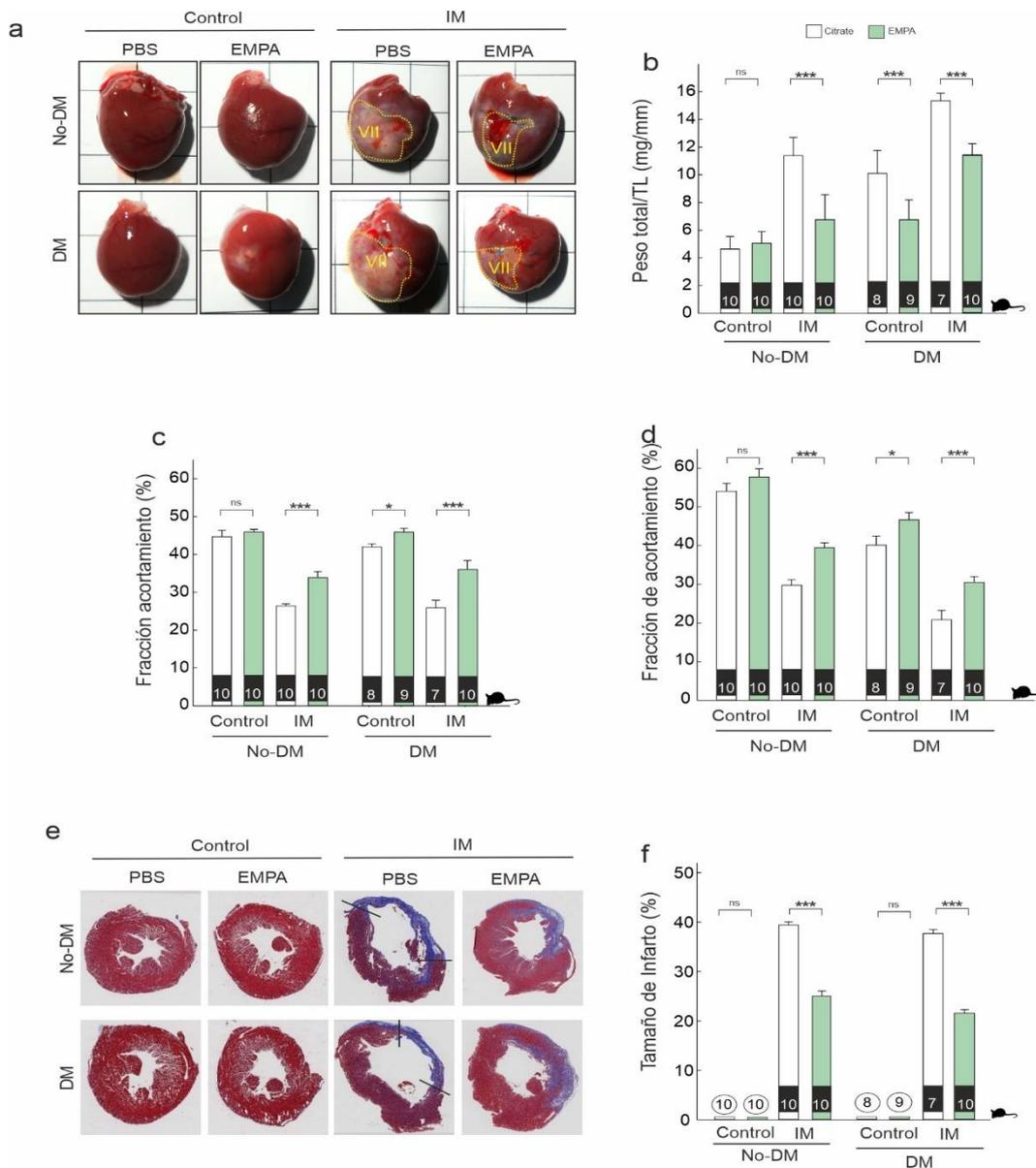


Figura 12. La terapia con empagliflozina mejora la remodelación cardíaca. (a) Imágenes representativas de todo el corazón, de corazones infartados, 4 semanas después de la cirugía. (b) Relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (VI/LT (peso del VI/longitud de la tibia)). (c, d) Análisis ecocardiográfico de fracción de acortamiento y fracción de eyección, respectivamente. (e, f) Izquierda; Secciones representativas de histología transversal del miocardio teñido con la tinción tricromica de Masson, de los grupos indicados tomados para las mediciones de tamaño de infarto (fijación de tejido 4 semanas después del IM). Las áreas ricas en colágeno (tejido cicatricial) están coloreadas en azul y el miocardio sano en rojo. Barra de escala: 0,5 cm. (Derecha). Cuantificación del tamaño del infarto. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . En la parte inferior de cada barra, número de animales analizados por grupo.

Se midieron varios marcadores de fibrosis e hipertrofia en la zona fronteriza del IM, y todos ellos se incrementaron, después del IM, en comparación con el miocardio de animales con cirugía simulada (Figura 13).

La terapia EMPA se asoció con niveles más bajos de ARNm de Col1a1 (Figura 13.a) tanto en grupos no DM (dif: -16.29 [-19.31, -13.42],  $P > 0.999$ ) como en grupos DM (dif: -26.9 [-30.17, -23.5],  $P > 0.999$ ). La terapia EMPA también se asoció con niveles más bajos de niveles de ARNm de Col3a1 tanto en animales no DM (dif: -34.06, [-38.34, -29.8],  $P > 0.999$ ) como en animales DM (dif.: -37.93, [-42.54, -33.16],  $P > 0.999$ ) (Figura 13.b).

Como se muestra en la figura 13.c y 13.d, la terapia EMPA disminuyó la acumulación de colágeno (tinción de Masson) tanto en animales no DM (diff: -8.24 [-9.75, -6.68],  $P > 0.999$ ) como en animales con infarto y DM (diff: -9,99 [-11,69, -8,36],  $P > 0,999$ ). La reducción de Col1a1 fue mayor en presencia de DM (diff-in-diff: -10.61, [-15.17, -5.97],  $P > 0.999$ ), mientras que la reducción de los niveles de Col3a1 (diff-in-diff: -3.86 [-10.2, 2.54]) y la acumulación de colágeno (diff-in-diff: -1.76 [-4.05, 0.51]) no difirió entre los grupos DM y no DM.

La relación Myh7/Myh6 y los niveles de ARNm de Nppa, como marcadores de hipertrofia, fueron menores en presencia del tratamiento con EMPA (Figura 13.e y 13.f). La terapia EMPA indujo una proporción más baja de Myh7/My6 en no DM (dif: -3.37, [-3.85, -2.87],  $P > 0.999$ ) y animales DM (dif: -4.37 [-4.9, -3.82],  $P > 0.999$ ).

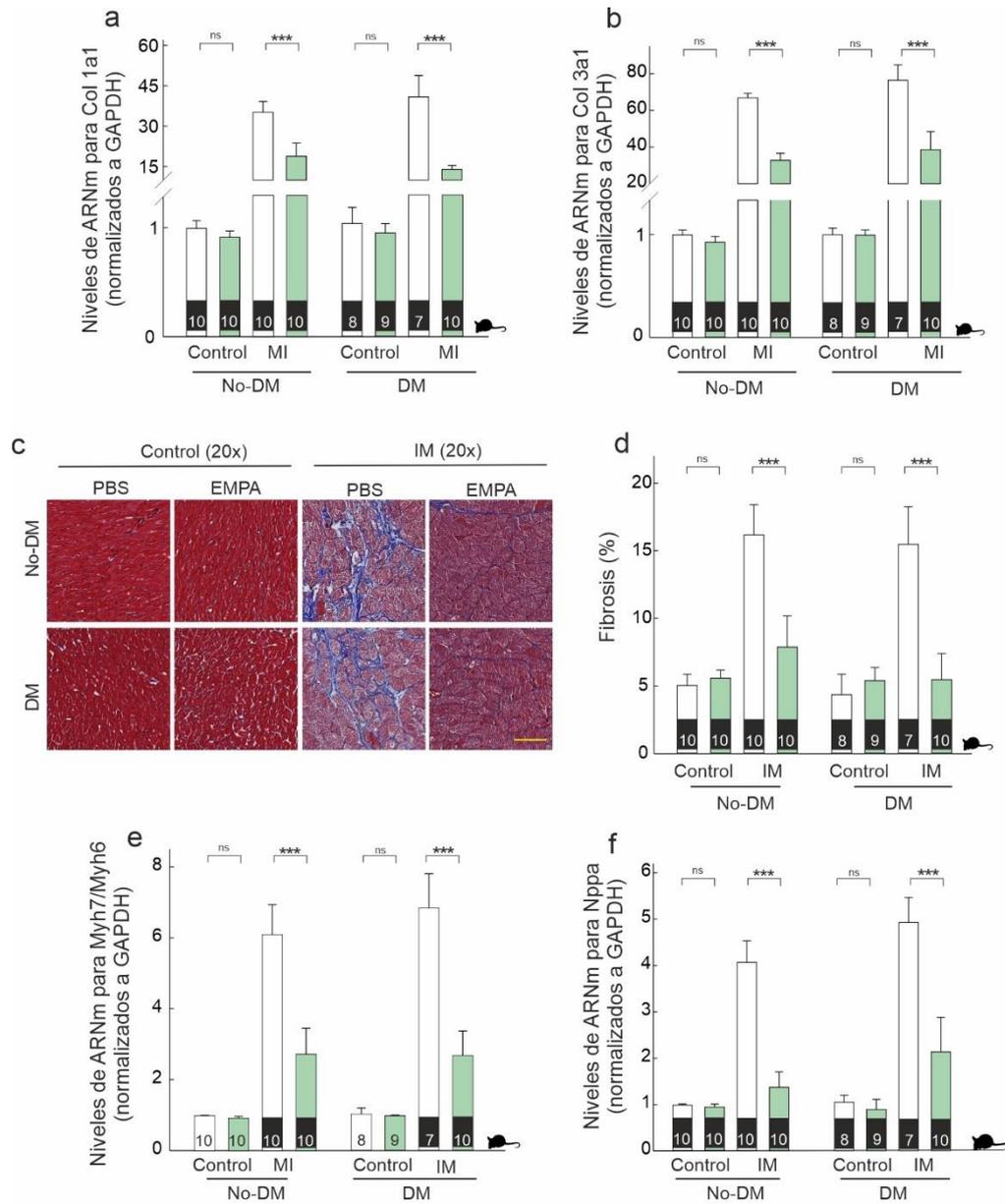


Figura 13. La terapia con empagliflozina previene la fibrosis y la hipertrofia. (a, b) Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de Col1a1 y Col3a1. (c) Secciones representativas del VI teñidas con Masson; Barras de escala: 25  $\mu$ m. (d) Colágenos asociados a fibrosis. (e, f) Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de la relación Myh7 / Myh6 y Nppa. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Resultados similares se evidenciaron en los niveles de ARNm de Nppa (Figura 13.f), con reducciones significativas tanto en grupos no DM (diff: -2.69 [-3.02, -2.37],  $P > 0.999$ ) como DM (diff: -2.9 [-3.28, -2.53],  $P > 0.999$ ). La magnitud de la reducción en la relación Myh7/Myh6 fue mayor en presencia de DM (diff-in-diff: -1.01 [-1.73, -0.29],  $P = 0.995$ ), mientras que los niveles de ARNm de Nppa no difirieron (diff-in diff: -0,21 [-0,71, 0,28]). En general, considerando todos los marcadores de fibrosis, el efecto de EMPA en los grupos de infarto DM fue 35% más alto (con IC de 95% entre 17% y 53%) en comparación con los grupos no DM. Del mismo modo, para los marcadores de hipertrofia, el efecto de EMPA fue un 52% mayor (IC del 95%: 30% a 81%) al de los grupos no DM (Figura 14).

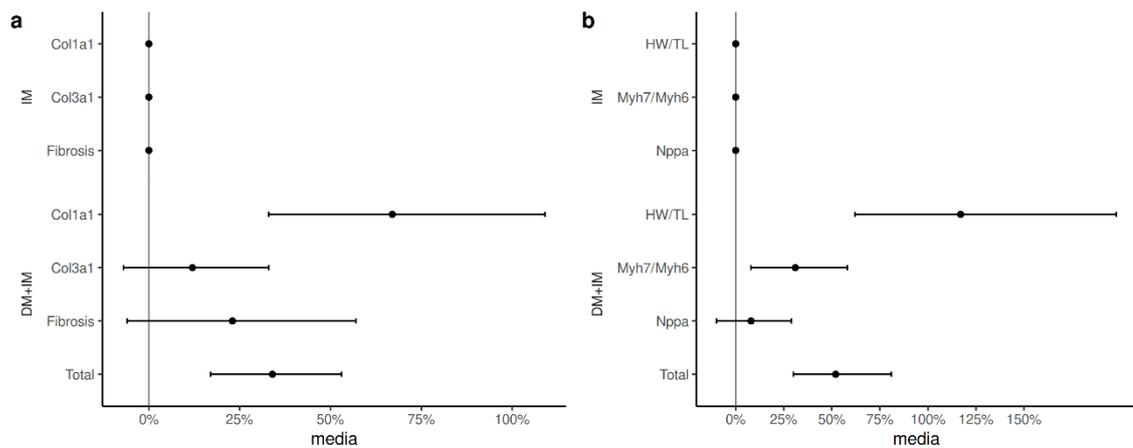


Figura 14. Efecto cardioprotector de la empagliflozina y análisis estadístico comparativo. Los puntos representan incrementos medios en porcentaje en el grupo infartado diabético respecto del no diabético y el error excluye los IC del 95%. a) Marcadores de fibrosis. b) Marcadores de hipertrofia cardíaca.

### 10.3 Efectos en la enzima GCH1, niveles de BH4 e isoforma NOS.

Aunque los niveles de ARNm de la proteína GCH1 cardíaca (cGCH1) no diferían en presencia de IM y/o DM, la expresión de la cGCH1 fue menor en presencia de IM o DM (Figura 15. a-b).

La terapia EMPA indujo un aumento de los niveles de ARNm y proteína cGCH1 en todas las condiciones experimentales (Figura 15.a-b), que fue mayor en presencia de DM en términos de ambos ARNm (diff-in-diff: -0.36 [-0.57, -0.14],  $P > 0.999$ ) y niveles de proteína (diff-in-diff: -0.63 [-0.86, -0.41],  $P > 0.999$ ).

La modulación de la proteína cGCH1 también se confirmó mediante tinción inmunohistoquímica, con resultados similares (Figura 15.c-d). La actividad cardíaca de GCH1 aumentó con la terapia EMPA, independientemente del estado diabético y del IM (Figura 15.e). Sin embargo, la magnitud de este efecto fue mayor en los animales DM que en los no DM (diff-in-diff: 0.47 [0.05, 0.88],  $P > 0.986$ ). Este efecto se tradujo en términos de niveles cardíacos de BH4 en todos los grupos experimentales (Figura 15.f), y la magnitud de este efecto fue mayor en los no DM (diff-in-diff: -1.12 [-1.96, -0.25],  $P = 0.994$ ).

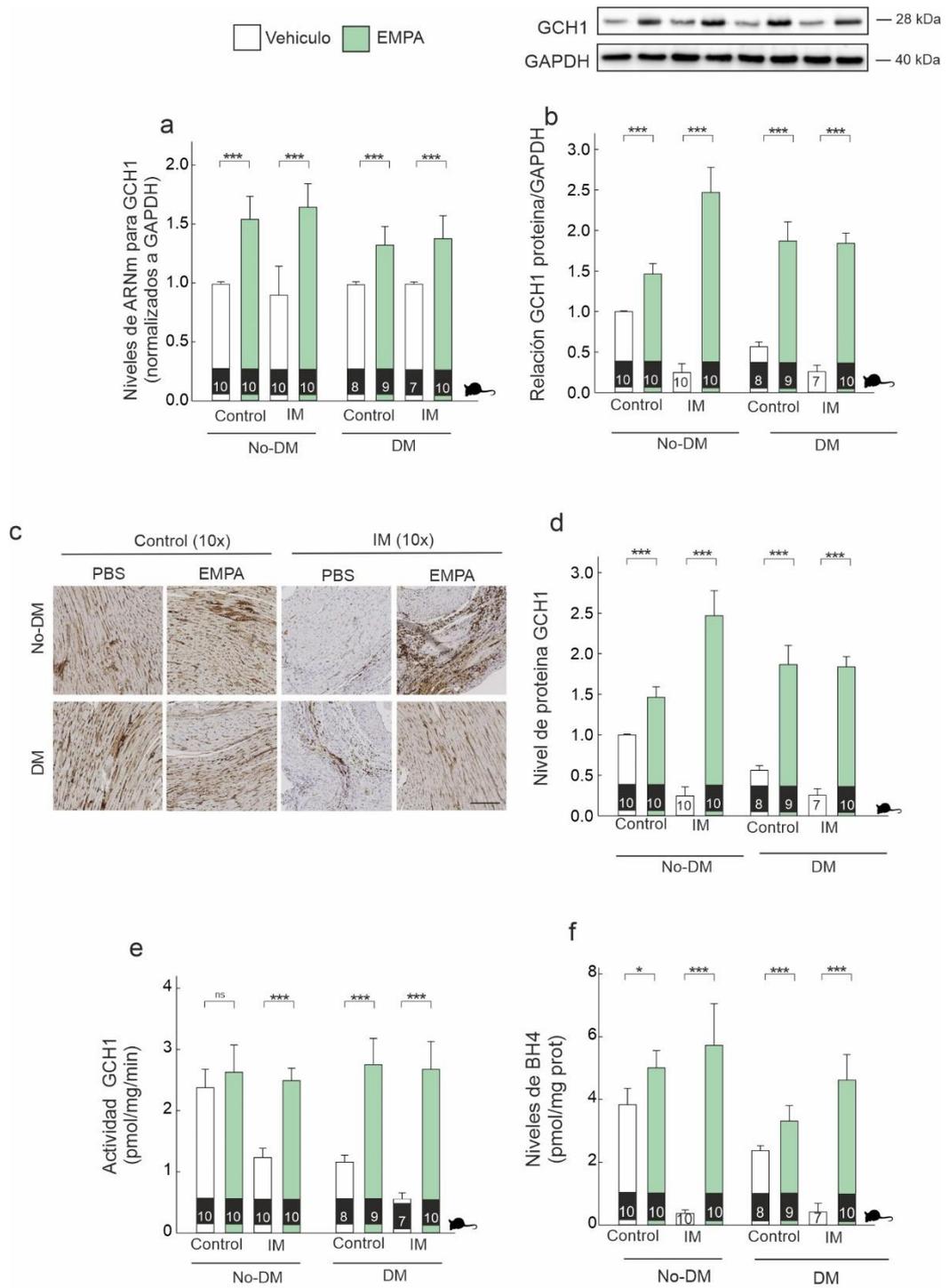


Figura 15. Empagliflozina modula los niveles de ARNm y proteína de cGCH1. (a) Expresión de ARNm cardíaco de cGCH1. (b) Análisis de transferencia Western representativo de cGCH1 en tejido de la zona fronteriza y análisis cuantitativo. (c-d) Tinción inmunohistoquímica de cGCH1 en la zona fronteriza; Barra de escala: 50  $\mu$ m. (e) Actividad cardíaca de GCH1. (f) Niveles de tetrahydrobiopterina. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

A continuación, evaluamos el estado de activación de nNOS, eNOS e iNOS. En presencia de DM o IM, el estado de fosforilación tanto de nNOS como de eNOS fue menor y la terapia con EMPA indujo un aumento en ambas isoformas (Figura 16.a-b). Este efecto fue mayor para nNOS en el grupo DM que no DM (diff-in-diff: 0.2 [0.01, 0.38], PP = 0.982), mientras que para eNOS el efecto fue mayor en el grupo no DM (diff-in-diff: -0,26 [-0,48, -0,05], PN = 0,991).

Con respecto a la proteína iNOS y los niveles de ON, ambos aumentaron en presencia de DM o IM, y la terapia EMPA se asoció con niveles más bajos de iNOS y niveles más altos de ON (Figura 16.c-d). Se observaron hallazgos similares en términos de niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Figura 16.e) y niveles de nitrotirosina (Figura 16.f).

Para todos estos marcadores (proteína iNOS, niveles de NO, niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y niveles de nitrotirosina) el efecto de la terapia EMPA fue similar en los grupos DM y no DM (diff-in-diff: -0.02 [-0.29, 0.24], 0.0 [-1.13, 1.11], -14.74 [-38.27, 8.92] y 0.07 [-0.16, 0.3], respectivamente).

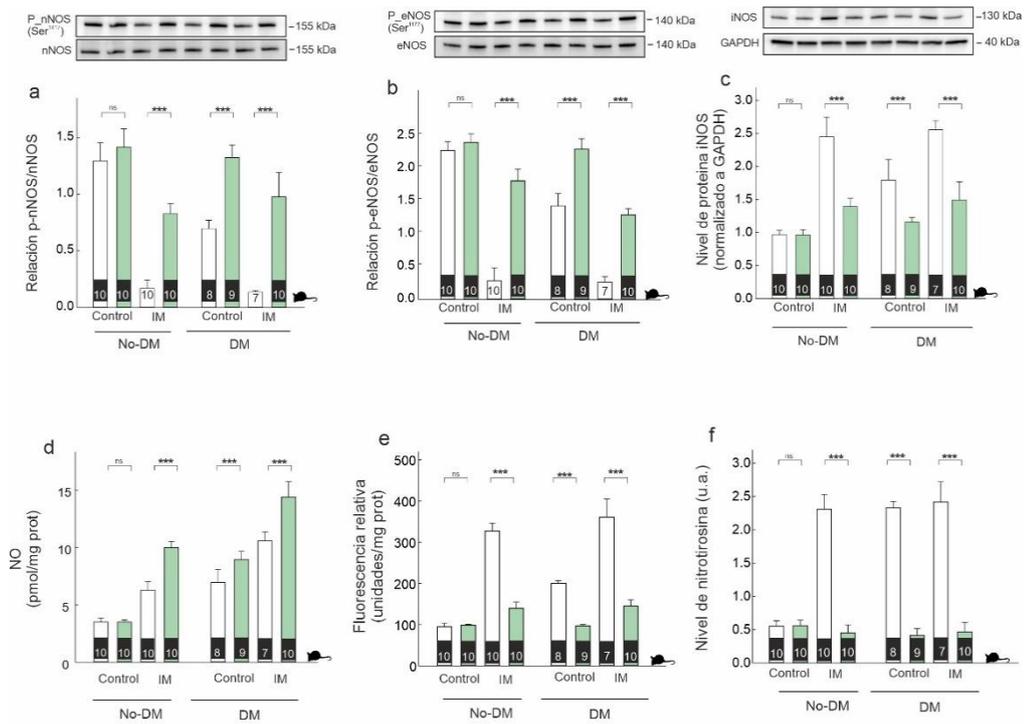


Figura 16. Empagliflozina modula la actividad de NOS. \*\*\*  $p < 0,001$ . (a) Bandas de western blot representativas que muestran la activación de nNOS. (b) Bandas de western blot representativas que muestran la activación de eNOS. (c) Bandas western blot representativas que muestran la modulación de iNOS. (d) Niveles de NO. (e) Niveles de  $O_2^-$ . (f) Niveles de nitrotirosina.

## 10.4 La modulación de la proteína cardíaca GCH1 media los efectos anti-hipertróficos de la empagliflozina

Con el fin de evaluar el papel de la proteína cGCH1 en los efectos cardioprotectores de EMPA, utilizamos un conjunto de cuatro pequeños siARN para derribar cGCH1 (siGCH1) y un modelo de estiramiento biomecánico diabético. La eficacia inhibitoria de siGCH1 se verificó por RT-PCR cuantitativa, western blot e inmunofluorescencia por microscopía confocal (Figura 17).

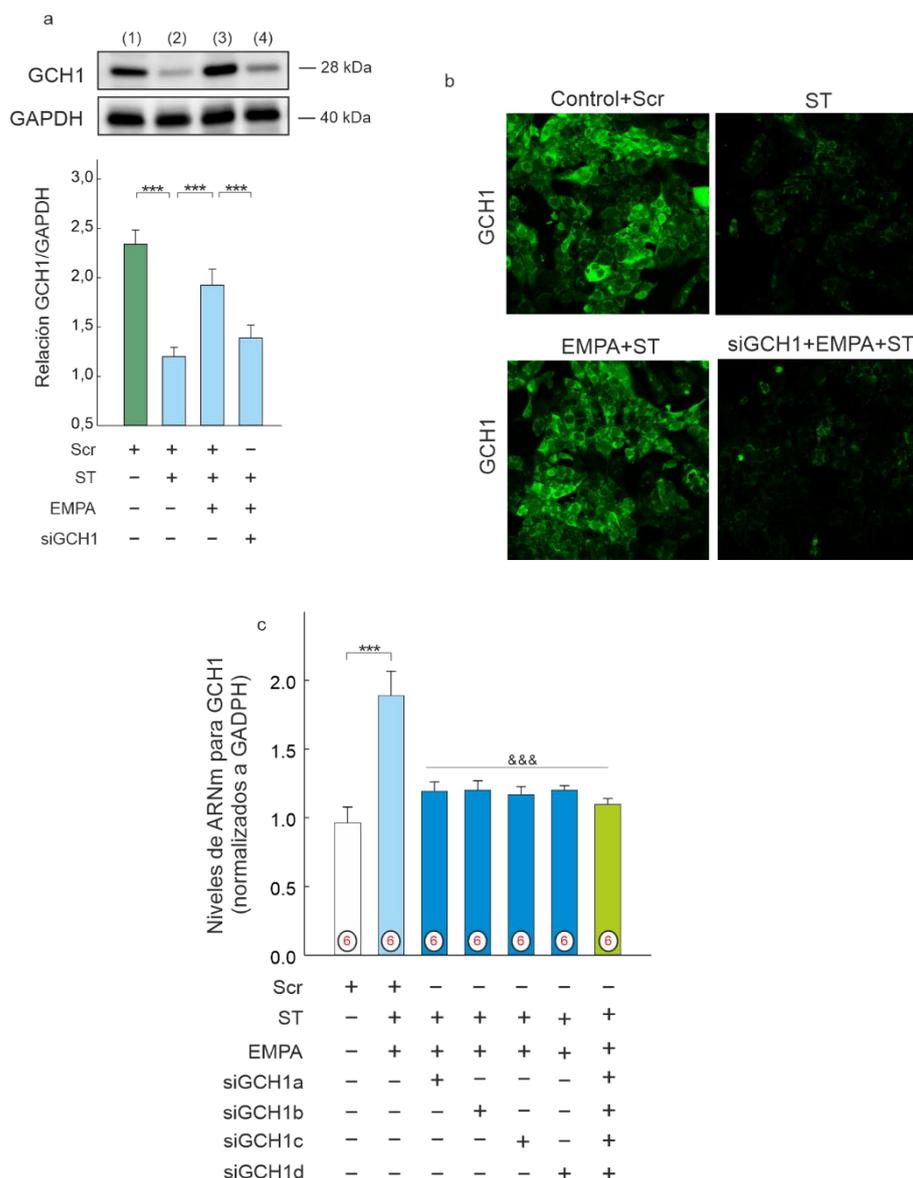


Figura 17. Silenciación efectiva de GCH1.

(a) Análisis de transferencia western representativo de GCH1; (Línea 1: Scramble; Línea 2: Scramble + Strain; Línea 3: Scramble + Strain + EMPA; Línea 4: Strain + EMPA + siGCH1). (b) Imágenes de microscopía confocal después del análisis de inmunofluorescencia realizado con cardiomiocitos primarios que expresan GCH1 (verde). (c) Los cardiomiocitos se preincubaron con scramble siRNA (scr), con una combinación de cuatro siRNAs para GCH1 (siRNA GCH1 a + b + c + d), o siRNAs individuales antes de la inducción de la tensión biomecánica durante 4 h. La expresión de ARNm de GCH1 se analizó por RT-PCR cuantitativa. Los números rojos representan cuántos experimentos independientes se realizaron por grupo (n = 6). Barra de escala: 50  $\mu$ m. ### p < 0.001 vs scr; &&& p < 0.001 vs Scr + EMPA + cepa biomecánica. Scr: Scramble; ST: tensión.

Como se muestra en la figura 17.a, la terapia EMPA indujo un aumento en los niveles de proteína cGCH1 cardíaca que se bloqueó por completo al silenciar la expresión de GCH1 (1.96 [1.81, 2.11] vs. 1.24 [1.09, 1.39]; EMPA + ST vs

iGCH1 + EMPA + ST). Se observaron resultados similares por inmunofluorescencia (Figura 17.b), el empeoramiento de la tinción citosólica de cGCH1 en células bajo "estiramiento bioquímico", en comparación con la tinción observada en condiciones de control, corroboró el hecho de que cGCH1 está regulada negativamente en respuesta a tensión biomecánica. El color verde en las imágenes coincidía con la localización citosólica de GCH1.

De manera similar, la terapia EMPA indujo la regulación positiva de GCH1 y nuevamente el silenciamiento de GCH1 endógeno evitó este efecto mediado por la terapia EMPA. La eficacia de estos siRNAs, combinados o únicos, para silenciar GCH1, se confirmó en cardiomiocitos mediante ensayos cuantitativos de RT-PCR (Figura 17). El aumento de la expresión inducida por EMPA de GCH1 después de la tensión biomecánica, se bloqueó por completo cuando la expresión de cada isoforma se silenciaba previamente con la combinación de los cuatro siRNA específicos a GCH1 ( $p < 0.001$  en todos los casos) (Figura 17). Se obtuvieron resultados similares cuando pre-silenciamos la expresión del gen GCH1 usando siRNAs individuales, citados como Figura 17.a-d. ( $p < 0,001$ ).

El tratamiento con siGCH1 bloqueó el efecto preventivo de la terapia EMPA en términos de niveles de BH4 (dif: -1.44 [-1.78, -1.11],  $PP > 0.999$ ) (Figura 18.a), área celular (dif: 82.6 [76.43, 88.89],  $PP > 0,999$ ) (Figura 18.b) e incorporación de aminoácidos (AA) (dif: 59,7 [51,89, 67,89],  $PP > 0,999$ ) (Figura 18.c).

La suplementación con BH4 exógeno, en presencia de EMPA, revirtió la acción de siGCH1 en el área celular (diff: -87.24 [-93.66, -80.73],  $PP > 0.999$ ) (Figura 18.b) y la incorporación de AA (diff: -64.79 [- 72,75, -56,65],  $PP > 0,999$ ) (Figura 18.c).

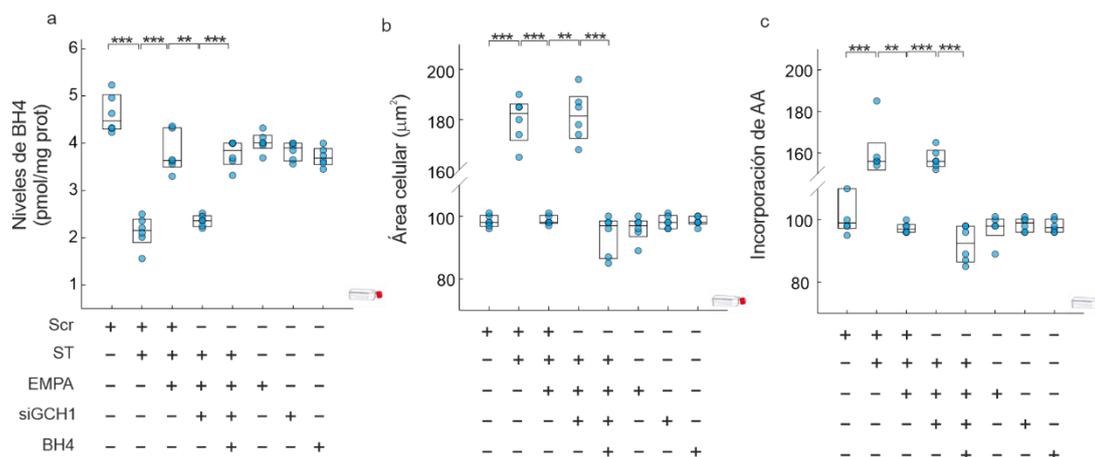


Figura 18. Empagliflozina previene la hipertrofia cardíaca.

(a) Niveles de BH4. (b) Análisis cuantitativo de las mediciones del tamaño celular in vitro de cardiomiocitos adultos. (c) Captación de leucina en cardiomiocitos. Todas las cuantificaciones derivan de seis experimentos independientes / grupo. Los resultados se muestran como diagramas de dispersión y se resumen con diagramas de caja. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

La terapia EMPA indujo un aumento en la fosforilación de nNOS y eNOS en sus respectivos sitios de activación Ser1417 y Ser1177 con respecto al estiramiento biomecánico (Figura 19.ab) (diff: 0.56 [0.45, 0.66],  $PP > 0.999$ ; diff: 0.77 [0.63, 0.9],  $PP > 0.999$ , respectivamente).

El tratamiento con siGCH1 evitó la fosforilación de nNOS y eNOS inducida por la terapia EMPA (diff: -0.42 [-0.53, -0.31],  $PN > 0.999$ ; diff: -0.73 [-0.87, -0.6],  $PN > 0.999$ ; respectivamente); y ambos efectos fueron revertidos cuando se suplementó con BH4 (diff: 0.47 [0.36, 0.58],  $PP > 0.999$ ; diff: 0.75 [0.61, 0.89],  $PP > 0.999$ ; respectivamente).

Todos estos efectos se reprodujeron en experimentos paralelos que evaluaron los niveles de ON (Figura 19.c),  $O_2^-$  (Figura 19.d) y nitrotirosina (Figura 19.e), como medidas de daño oxidativo.

En ausencia de estiramiento, el uso de EMPA, siGCH1 o BH4 no tuvo efecto sobre los parámetros evaluados. Además, las células expuestas a altos

niveles de manitol (25 mM) no mostraron alteración de los parámetros analizados.

Finalmente, el tratamiento con siGCH1 bloqueó el efecto preventivo de la terapia EMPA en la organización cardíaca de la  $\alpha$ -tubulina, lo que resultó en la interrupción de la arquitectura normal de los microtúbulos, como lo revela la microscopía de inmunofluorescencia confocal (Figura 19.f).



## 10.5 Efectos de la Empaglifozina en parámetros metabólicos en ratas

### Wistar con o sin DM

Los parámetros plasmáticos han indicado un aumento en los niveles de glucemia y  $\text{Na}^+$  plasmático, mientras que el  $\text{K}^+$  plasmático disminuyó en comparación con los grupos no DM, después de 3 días de inyección de STZ (Tabla anexo 9 y línea azul en la figura 20).

La terapia EMPA disminuyó significativamente la glucemia y los niveles de  $\text{Na}^+$ , mientras que aumentó los niveles de  $\text{K}^+$  (Tabla anexo 9 y línea roja en la figura 20).

Además, la terapia EMPA aumentó la glucosa urinaria y la excreción de  $\text{Na}^+$  (Tabla anexo 10 y línea roja en la figura 21) en paralelo con un aumento en el volumen de orina y no tuvo efecto sobre la relación albúmina/creatinina. El aumento de la diuresis después del tratamiento con EMPA se compensó con un aumento proporcional en la ingesta de líquidos (Tabla anexo 11 y línea roja en la figura 21).

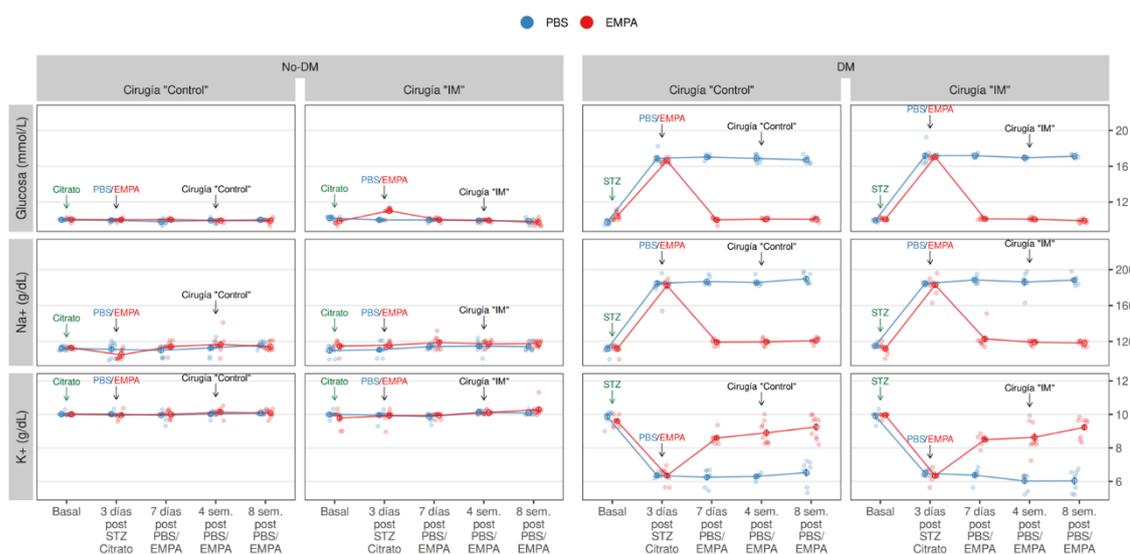


Figura 20. Efectos de EMPA en parámetros plasmáticos en DM y no DM.

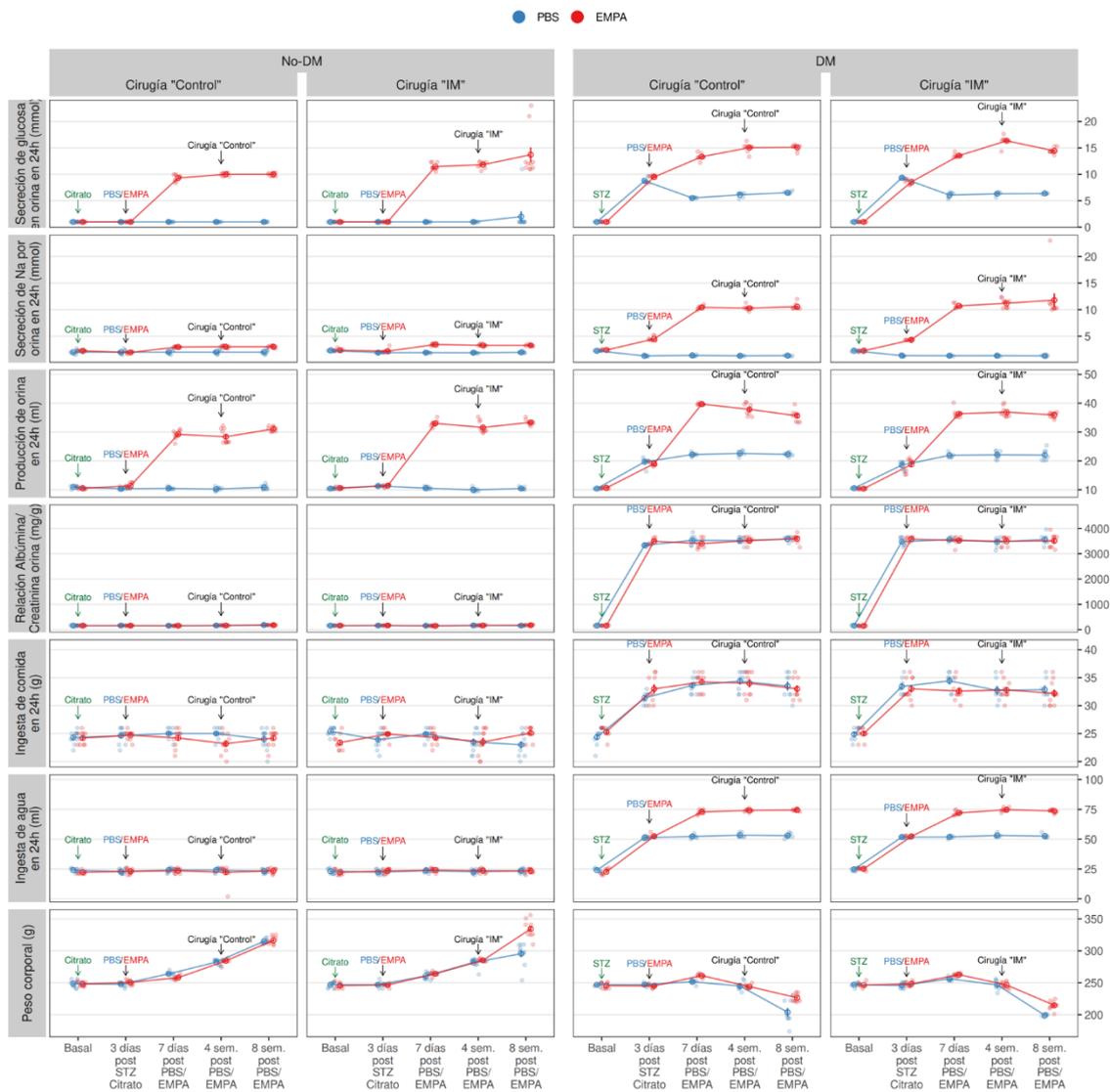


Figura 21. Efectos EMPA en parámetros urinarios e ingesta.

# 11. DISCUSIÓN



En relación a la hipótesis principal de este estudio, podemos concluir que la inhibición del receptor SGLT2 con la EMPA proporciona un mecanismo terapéutico para proteger el remodelado y disfunción cardíaca tras un proceso isquémico agudo tanto en pacientes con DM como no DM, como muestran los datos previamente mencionados. Este beneficio, por tanto, ayuda a reducir la morbimortalidad, el riesgo CV y los costes sanitarios asociados a las complicaciones CV en pacientes con o sin DM, grupo de pacientes de elevada prevalencia.

En relación al objetivo principal del estudio, la influencia de la EMPA en la progresión del remodelado y función miocárdica tras la isquemia aguda y sus posibles mecanismos miocárdicos subyacentes, muestra la participación de GCH1 y la vía NOS como contribuyentes principales en este beneficio, siendo la participación de otros, como el control glucémico, glucosuria, natriuresis y pérdida ponderal, insuficientes para justificar por sí mismos un beneficio a nivel miocárdico o en parámetros de mortalidad CV, pero posiblemente coadyuvantes en este efecto.

Así pues, el presente estudio proporciona la primera evidencia que vincula los efectos cardioprotectores de EMPA con la regulación positiva de cGCH1 después de un IM. Nuestros resultados demuestran que la regulación positiva de cGCH1 inducida por EMPA aumenta los niveles de BH4, activa tanto la enzima eNOS como la enzima nNOS y mejora la actividad de iNOS, lo que lleva a un aumento de los niveles de ON cardíaco disponibles, así como a una disminución en los niveles de O<sub>2</sub>- y nitrotirosina. Juntos, estos efectos conducen a una mejora en el remodelado miocárdico que sí puede justificar los beneficios en datos de IC, y muerte de causa CV.

Contextualizando el descubrimiento de la nueva diana terapéutica en DM, los i-SGLT2, y su beneficio CV al inicio de este estudio, la evidencia científica disponible se enfocaba hacia la EMPA (21) y canagliflozina (105,116), primeras moléculas con estudios de seguridad CV que mostraron de manera consistente beneficios y que sugerían un posible efecto protector de esta familia terapéutica en la IC (117–120).

Así pues, EMPA-REG OUTCOME evaluó la seguridad CV a largo plazo y los posibles beneficios microvasculares y macrovasculares de EMPA 10 mg o 25 mg en pacientes con DM2 y enfermedad CV establecida. EMPA añadida al tratamiento estándar redujo significativamente el riesgo de la variable primaria compuesta de muerte CV, IM no fatal e ictus no fatal en comparación con placebo en un 14% (HR 0,86; IC del 95% 0,74, 0,99;  $p=0,04$  para superioridad). En comparación con placebo, el riesgo de muerte CV, IC y mortalidad por todas las causas se redujo con EMPA en un 38%, 35% y 32%, respectivamente. Los pacientes con IC fueron aproximadamente el 10% de la población del ensayo EMPA-REG OUTCOME (10,5% y 9,9% de los pacientes en los grupos placebo y EMPA, respectivamente).

Sin embargo, el EMPA-REG OUTCOME no se diseñó para evaluar el efecto de EMPA en pacientes con IC y los hallazgos de este pequeño subgrupo se consideraron generadores de hipótesis.

Los análisis del EMPA-REG OUTCOME han sugerido que los efectos de EMPA sobre la muerte CV y la IC fueron independientes de sus efectos reductores de glucosa. Además, se ha sugerido que varios de estos mecanismos que no reducen la glucosa pueden ser beneficiosos para los pacientes con IC independientemente de su estado diabético.

Como hemos comentado, al no diseñarse EMPAREG específicamente para la hipótesis de estudio en IC, se han diseñado a posteriori ensayos que forman parte del programa de IC de EMPA y poder investigar así los efectos de esta molécula en pacientes con IC con y sin DM en diferentes condiciones clínicas. Entre ellos, encontramos EMPA-RESPONSE-AHF, que estudia los efectos de EMPA sobre los resultados clínicos en pacientes con IC aguda descompensada; EMPEROR-Reduced, ensayo de EMPA en pacientes con ICFER con o sin DM2; EMPEROR-Preserved, ensayo de resultados de EMPA en pacientes con ICFEP con o sin DM2; Empire HF, ensayo para evaluar parámetros renales en pacientes con ICFER, con o sin DM2; EMPERIAL-Reduced y Preserved, ensayo en pacientes con ICFER e ICFEP respectivamente, con o sin DM, con el objetivo de evaluar la capacidad funcional, tolerancia al ejercicio y su sintomatología (121–126).

Seguendo los algoritmos de tratamiento de la SEC, el uso de los i-SGLT2 en pacientes con IC con o sin DM es a día de hoy una práctica clínica habitual, dada la evidencia y seguridad que ofrecen en el tratamiento de este tipo de pacientes (127). Según un reciente metaanálisis, el efecto del tratamiento con EMPA y Dapagliflozina sobre las hospitalizaciones por IC son consistentes, reducen la muerte por todas las causas y por causas CV en pacientes con ICFER, además de ofrecer otros beneficios, como a nivel renal, con una disminución de la progresión del daño o deterioro de la función renal (121).

Una creciente evidencia sugiere que la EMPA atenúa el remodelado cardíaco adverso en diferentes modelos experimentales, como el IM inducido por ligadura de LAD, constricción aórtica torácica o infusión de isoproterenol (119,128–131), independientemente de su acción sobre los receptores SGLT2

en los riñones (128,132). Estos estudios respaldan las propiedades cardioprotectoras de la terapia EMPA, ya que su administración a largo plazo redujo los niveles de expresión de diferentes moléculas pro-fibróticas y pro-hipertróficas, así como la formación de cicatriz y fibrosis intersticial en el tejido de la zona fronteriza. Sin embargo, a pesar de esta creciente evidencia, ni el mecanismo molecular ni la vía de señalización involucrados en las acciones cardioprotectoras de EMPA se entienden completamente. Uno de los primeros estudios experimentales sobre esta hipótesis generada a partir del EMPAREG, sugiere que la EMPA reduce la IC y muerte CV directamente por un efecto a nivel miocárdico, reduciendo la MCD, a través de la regulación a la baja de la expresión de los receptores miocárdicos SGLT1, SGLT2 y GLUT1 (133).

Tras contextualizar nuestros resultados con la evidencia disponible hasta ahora, la originalidad del trabajo que presentamos, se basa en la base molecular que subyace al efecto beneficioso de EMPA en el remodelado cardíaco adverso inducido tras un IM. Además, nuestros hallazgos amplían las observaciones previas al comparar el efecto de la terapia EMPA en el miocardio no DM versus DM en el post-IM. Encontramos que EMPA previno la remodelación miocárdica en ambos contextos, aunque la magnitud del efecto fue mayor entre los animales DM (Figura 14).

En un estudio publicado recientemente por Yurista y col., se evidencia que tanto una mejora en el metabolismo cardíaco y producción de ATP como una disminución en el daño oxidativo, podrían estar relacionados con los efectos beneficiosos evaluados (128), como también lo revela otro estudio publicado más tarde por Iborra-Egea y col. (129). En otro estudio experimental, con modelo de isquemia-reperfusión, se evaluó el beneficio del tratamiento de EMPA, tanto

en la disminución del tamaño del IM como una mejora del EO y función mitocondrial, in vivo e in vitro (131). Sin embargo, estos estudios no se centraron en evaluar las vías de señalización asociadas con el efecto anti-remodelado de la terapia EMPA.

Los resultados del presente estudio revelan por primera vez una relación directa entre la activación farmacológica de cGCH1 por EMPA y la activación del eje BH4/NOS/NO, evitando la remodelación cardíaca adversa después de un IM.

Varios estudios han demostrado que cGCH1, que es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de novo de BH4 (115), se regula negativamente durante la remodelación cardíaca adversa que afecta la función cardíaca (104,134,135). En 2016, Wu y col., establecieron que cGCH1 podría ser una diana terapéutica potencial para el tratamiento del IM en la clínica (104), como lo reveló otro estudio publicado más tarde para demostrar que la sobreexpresión transgénica de cGCH1 en cardiomiocitos mejora la remodelación cardíaca después de IM (136). Estos autores también revelaron que una sobreexpresión transgénica de la proteína cGCH1 está relacionada con un menor tamaño de infarto (136). En otros ensayos se sugiere que el mantenimiento de la función mitocondrial, con L-Carnitina, previene la degradación de cGCH1 y secundariamente el desacoplamiento de eNOS y la DE (137). En el estudio actual, mostramos que la expresión de cGCH1 disminuye en los corazones y cardiomiocitos que fallan al estirarse (Figura 15.b), lo que está relacionado con un deterioro de la función y un aumento de la hipertrofia cardíaca (Figura 12 y Tabla 5). Además, nuestros hallazgos demuestran que la terapia EMPA no solo mejoró la remodelación cardíaca post IM, sino que también disminuyó el tamaño del infarto, un efecto que se asoció con un aumento en los niveles de proteína

cGCH1 en el miocardio (Figuras 12 y 13). Andreadou y col., recientemente han demostrado que la terapia EMPA es capaz de atenuar el IM en un modelo de rata diabética (131). Del mismo modo, Lim y col., informaron que el tratamiento a largo plazo con Canaglifozina vía oral atenúa el IM en ratas no DM y DM (138).

Los datos presentados aquí están en buen acuerdo con los estudios mencionados anteriormente. De hecho, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con EMPA oral a largo plazo atenúa el IM en ratas no DM y DM (Figura 12.e-f). Téngase en cuenta que nuestros resultados contrastan con los datos publicados por Yurista y col., quienes informaron que la terapia EMPA no tiene ningún efecto sobre el tamaño del IM (128). Creemos que las diferencias metodológicas pueden explicar las discrepancias involucradas. Más específicamente, mientras que la terapia EMPA comenzó después del IM por el grupo Yurista, todos nuestros estudios se llevan a cabo con animales que fueron tratados con EMPA cuatro semanas antes de la inducción del IM (Figura 10.b). Por lo tanto, esta diferencia sugiere que el momento y/o la duración de la terapia EMPA pueden ser relevantes y deben estar presentes en el momento o antes del IM para efectos cardioprotectores.

La evidencia acumulada destaca la implicación del estrés cardíaco oxidativo-nitrosativo en la remodelación cardíaca mediada por IM (103). Mount y col., señalaron el papel clave de BH4 en la producción de ON a través de un aumento en la fosforilación de eNOS y nNOS; que conduce a una supresión del EO/nitrosativo miocárdico (98). Posteriormente Bailey y col., muestran nuevamente el papel de BH4-cGCH1, sugiriendo que BH4 presenta un papel esencial en el balance oxidativo a nivel mitocondrial (114), así como Chuaiohichai y col., en el endotelio vascular (139). El presente estudio

proporciona evidencia de que la terapia EMPA actúa como un activador dual de eNOS y nNOS (Figura 16.a-b), permitiendo tanto un aumento en los niveles de ON (Figura 16.d) como una disminución en los niveles de  $O_2^-$  (Figura 16.e).

Un nuevo hallazgo de nuestro estudio es el efecto diferencial de la terapia EMPA en la isoforma iNOS. Ceriello y col., utilizando un modelo diabético experimental, demostraron un aumento en la expresión del gen iNOS, en paralelo al aumento simultáneo de la producción de NO y  $O_2^-$  (140). Los datos presentados aquí están en buen acuerdo con el estudio mencionado anteriormente. De hecho, nuestros resultados demuestran un aumento significativo en los niveles de NO y  $O_2^-$  tanto en DM como en IM (Figura 16.d-e). Dado que eNOS y nNOS disminuyeron en ratas no DM infartadas y en ratas DM con o sin oclusión coronaria, el ON deriva de un aumento significativo en la actividad de iNOS (Figura 16.c). Varios estudios han determinado que el ON derivado de iNOS puede inducir daño miocárdico (141,142). La reacción entre ON y altos niveles de  $O_2^-$ , conduce a formar nitrotirosina (Figura 16.d-f). De hecho, bajo niveles elevados de  $O_2^-$ , el ON puede reaccionar y se forma más nitrotirosina, alteración del ratio BH4-BH2 y desacoplamiento de la eNOS (135). La nitrotirosina ejerce efectos nocivos, que se vuelven más relevantes que el efecto protector del ON bajo su presencia. De hecho, cuando se incorporó nitrotirosina libre en el terminal carboxilo de la  $\alpha$ -tubulina en los microtúbulos, se observó una organización alterada de los microtúbulos y una redistribución de la proteína citoplasmática motora dineína (143) (Figura 19.f). Nuestros datos determinan que la terapia EMPA puede prevenir estos efectos nocivos, al aumentar los niveles de BH4 a través de la activación de cGCH1, lo que provoca una activación en la actividad de eNOS y nNOS, así como una disminución de la

actividad de iNOS. Esto conduce a un aumento del ON, disminución en O<sub>2</sub>- y, como se esperaba, una reducción significativa en los niveles de nitrotirosina. Además, nuestros datos sugieren que este efecto preventivo de la terapia EMPA está presente después del IM y se potencia en presencia de DM.

Para proporcionar más apoyo a este argumento y desde el efecto preventivo asociado con la terapia EMPA, hemos utilizado un modelo de hipertrofia diabética en presencia de altas concentraciones de glucosa. Encontramos que la respuesta hipertrófica en términos de área celular e incorporación de AA fue evitada por EMPA (Figura 18), de acuerdo con los hallazgos en el modelo animal. En este modelo experimental, investigamos una relación directa entre la modulación de cGCH1 y el efecto cardioprotector de la terapia EMPA. Primero, la regulación al alza de BH4 inducida por la terapia EMPA en condiciones hipertróficas se bloqueó en cardiomiocitos adultos que carecen de cGCH1 endógeno. En consecuencia, condujo a la inactivación de eNOS y nNOS y una disminución de la regulación de ON. Por lo tanto, estos hallazgos apuntan a la participación directa de BH4, dado que la administración de BH4 exógeno revirtió los efectos negativos observados con siGCH1 (Figuras 18 y 19).

En relación a los objetivos secundarios, según los resultados de nuestro estudio y el desconocimiento en los mecanismos moleculares tanto a nivel miocárdico como en otros órganos como el riñón o a nivel sistémico, podemos establecer que estos fármacos actúan no sólo a nivel miocárdico, por lo que su potencial beneficio probablemente no está sólo vinculado al miocardio en situación de isquemia aguda. A nivel sistémico, se evidencia que en los animales tratados con EMPA se produce un descenso tanto de los niveles de glucemia

plasmática como de Na<sup>+</sup> y un aumento de K<sup>+</sup> respecto a los no tratados (Tabla anexo 9 y línea roja en la figura 20).

Además, la terapia EMPA aumentó la glucosa urinaria y la excreción de Na<sup>+</sup> (Tabla anexo 10 y línea roja en la figura 21) en paralelo con un aumento en el volumen de orina, sin efecto sobre la relación albúmina/creatinina durante la duración del estudio (no estudios a nivel tisular de tejido renal). El aumento de la diuresis después del tratamiento con EMPA se compensó con un aumento proporcional en la ingesta de líquidos (Tabla anexo 11 y línea roja en la figura 21).

Por tanto, la terapia con EMPA produce un efecto de diuresis osmótica y natriuresis, mecanismos establecidos como posible causa de la mejora en las cifras de TA, pérdida de peso y secundariamente posible reducción de RCV (144,145). En nuestro estudio no se ha mostrado mejora significativa en las cifras del cociente albúmina/creatinina, por lo tanto, no hemos obtenido beneficio en el enlentecimiento en la progresión del deterioro en función renal, como sí han demostrado otros estudios enfocados en su efecto, seguridad y beneficio a nivel renal (116,146–148).

La DM2 se caracteriza por una supresión tanto de la vía SIRT1 como de la AMPK. Esta modificación tiene relación directa con el incremento en el EO y la MCD. La metformina y los i-SGLT2 activan las vías SIRT1 y AMPK, pudiendo explicar cierto beneficio a nivel miocárdico-mitocondrial. Pero, ambas actúan por vías distintas, así la metformina principalmente actúa como agonista de la vía AMPK y supresión de la Akt/mTOR, mientras que los inhibidores del SGLT2 inducen la producción de cuerpos cetónicos, marcador que estimula la vía SIRT1, lo que también podría justificar su efecto en disminución del EO (149),

aunque no disponemos de datos en nuestro estudio acerca de esta hipótesis. Los iSGLT2 producen glucosuria, como hemos mostrado en nuestros datos, lo que produce una pérdida calórica e induce un estímulo SIRT1, principal sensor de depleción de glucosa. A su vez, también estimulan PGC-1alfa y AMPK, lo que puede explicar su papel en estabilización del potencial de membrana mitocondrial, estructura mitocondrial, capacidad de producción de ATP y a mitigar el daño en el ADN (149), es decir, aumentando la biogénesis mitocondrial. Otro posible mecanismo de acción beneficioso de estos fármacos es mediante la disminución de las concentraciones celulares de Na<sup>+</sup>, mediado por el estímulo de SIRT1/AMPK, dado que el flujo de Na<sup>+</sup> al interior de la célula es un mecanismo descrito de daño miocárdico en la MCD (149).

Dada la relación entre la IC y la DM, la prevención de la IC podría ser a su vez sinónimo de prevención de DM y RI y viceversa. Hasta ahora, el objetivo de tratamiento era el de mejorar la glucemia sin agravar la retención de fluidos, sin aumentar el peso y sin aumentar el riesgo cardiovascular. Ahora, esta nueva diana terapéutica probablemente nos permiten hacerlo de forma conjunta (39).

# **12. CONCLUSIONES**



Este estudio demuestra que la empagliflozina ejerce efectos anti-remodelado directos en presencia de disfunción sistólica del VI después del IM, que es independiente del estado de la DM o incluso en normoglucemia, aunque en mayor medida en presencia de ambas afecciones patológicas. Además, la activación de la proteína GCH1 cardíaca fue un mediador relevante de los efectos beneficiosos del miocardio de EMPA, al reducir el EO en presencia de IM y/o DM.

Gracias a estos resultados podemos explicar, en cierta medida, un mecanismo que justifique los beneficios hallados en los estudios de seguridad CV de esta nueva diana terapéutica. Pese a ello, dada la relevancia a nivel clínico en éstos, muchos otros mecanismos desconocidos hasta la fecha deben estar implicados, por lo que nuevas líneas de investigación intentarán dar respuesta a esta cuestión que surge en la comunidad científica y la práctica clínica habitual.



# **13. LIMITACIONES**



Este estudio tiene varias limitaciones, que deben señalarse. Primero, nuestras conclusiones se basan en datos obtenidos utilizando un modelo de estiramiento biomecánico de eliminación in vitro.

El siguiente paso sería construir una base de evidencia general más sólida utilizando un modelo animal preclínico para probar la modulación de este nuevo biomarcador. Además, no se han realizado estudios en el área infartada; donde pocos miocitos viables coinciden con otros tipos de células.

Por otro lado, las diferencias en el tamaño del infarto analizado después del tratamiento con EMPA versus ningún tratamiento pueden estar relacionadas con la formación de nuevos vasos, por lo que es importante analizar este efecto cardíaco.

Los perfiles de ARNm de GCH1 difieren dramáticamente de los perfiles de proteína de GCH1; nuestros resultados no aclaran por qué ocurre esto, y sugieren que cualquier efecto de la EMPA se produce a nivel postranscripcional. Además, el análisis y la interpretación de los datos no establecieron si existe o no un efecto directo o indirecto de EMPA sobre la proteína GCH1 cardíaca; son necesarios otros ensayos para caracterizar intermedios plausibles.



# 14. BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

1. Zghebi SS, Steinke DT, Carr MJ, Rutter MK, Emsley RA, Ashcroft DM. Examining trends in type 2 diabetes incidence, prevalence and mortality in the UK between 2004 and 2014. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19(11):1537-45.
2. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(2):88-98.
3. Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano F, Fernández-Fernández I. [Diabetes mellitus in Spain: death rates, prevalence, impact, costs and inequalities]. *Gac Sanit.* marzo de 2006;20 Suppl 1:15-24.
4. Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, Prieto MA, Bordiú E, Calle A, et al. Prevalence, Diagnosis, Treatment, and Control of Hypertension in Spain. Results of the Di@bet.es Study. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed.* junio de 2016;69(6):572-8.
5. Ortega E, Amor AJ, Rojo-Martínez G, Castell C, Giménez M, Conget I. [Cardiovascular disease in patients with type 1 and type 2 diabetes in Spain]. *Med Clin (Barc).* 21 de septiembre de 2015;145(6):233-8.
6. Valdés S, Rojo-Martínez G, Soriguer F. [Evolution of prevalence of type 2 diabetes in adult Spanish population]. *Med Clin (Barc).* 15 de septiembre de 2007;129(9):352-5.
7. Mata-Cases M, Artola S, Escalada J, Ezkurra-Loyola P, Ferrer-García JC, Fornos JA, et al. [Consensus on the detection and management of prediabetes. Consensus and Clinical Guidelines Working Group of the Spanish Diabetes Society]. *Aten Primaria.* septiembre de 2015;47(7):456-68.
8. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 8 de noviembre de 2011;8(4):228-36.
9. Lascar N, Brown J, Pattison H, Barnett AH, Bailey CJ, Bellary S. Type 2 diabetes in adolescents and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(1):69-80.
10. Meo SA, Sheikh SA, Sattar K, Akram A, Hassan A, Meo AS, et al. Prevalence of Type 2 Diabetes Mellitus Among Men in the Middle East: A Retrospective Study. *Am J Mens Health.* junio de 2019;13(3):1557988319848577.

11. Franch Nadal J, Mata Cases M, Mauricio Puente D. Epidemiology and clinical management of type 2 diabetes mellitus and associated comorbidities in Spain (e-Management study). *Med Clin (Barc)*. noviembre de 2016;147 Suppl 1:1-7.
12. Wilmot EG, Davies MJ, Yates T, Benhalima K, Lawrence IG, Khunti K. Type 2 diabetes in younger adults: the emerging UK epidemic. *Postgrad Med J*. diciembre de 2010;86(1022):711-8.
13. Passa P. Diabetes trends in Europe. *Diabetes Metab Res Rev*. octubre de 2002;18 Suppl 3:S3-8.
14. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, Levy D, Meigs JB, D'Agostino RB, et al. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 24 de noviembre de 2004;292(20):2495-9.
15. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SECCAID: Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes) [Internet]. [citado 20 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-avances-diabetologia-326-pdf-S1134323013000975>
16. Pedro-Botet J, Chillarón JJ, Benaiges D, Flores-Le Roux JA. [Cardiovascular prevention in diabetes mellitus: A multifactorial challenge]. *Clin E Investig En Arterioscler Publicacion Of Soc Espanola Arterioscler*. junio de 2016;28(3):154-63.
17. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 23 de julio de 1998;339(4):229-34.
18. Bulughapitiya U, Siyambalapitiya S, Sithole J, Idris I. Is diabetes a coronary risk equivalent? Systematic review and meta-analysis. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. febrero de 2009;26(2):142-8.
19. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. julio de 1974;34(1):29-34.
20. Guglin M, Villafranca A, Morrison A. Cardiogenic diabetes. *Heart Fail Rev*. septiembre de 2014;19(5):595-602.
21. Zinman B, Lachin JM, Inzucchi SE. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 17 de marzo de 2016;374(11):1094.
22. Luconi M, Raimondi L, Di Franco A, Mannucci E. Which is the main molecular target responsible for the cardiovascular benefits in the EMPAREG OUTCOME trial? A journey through the kidney, the heart and other interesting places. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 10 de septiembre de 2016;

23. Cañón-Barroso L, Cruces-Muro E, Fernández-Ochoa G, Nieto-Hernández T, García-Vellido A, Buitrago F. Validación de tres ecuaciones de riesgo coronario en población diabética de un centro de salud. *Med Clínica*. 1 de abril de 2006;126(13):485-90.
24. Jimeno Mollet J, Molist Brunet N, Franch Nadal J, Serrano Borraz V, Serrano Barragán L, Gracia Giménez R. Variabilidad en la estimación del riesgo coronario en la diabetes mellitus tipo 2. *Aten Primaria*. 1 de enero de 2005;35(1):30-6.
25. Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, Stratton IM, United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56). *Clin Sci Lond Engl* 1979. diciembre de 2001;101(6):671-9.
26. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 1 de junio de 2003;24(11):987-1003.
27. Ofstad AP. Myocardial dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*. julio de 2016;76(4):271-81.
28. Santos-Ferreira D, Gonçalves-Teixeira P, Fontes-Carvalho R. SGLT-2 Inhibitors in Heart Failure and Type-2 Diabetes: Hitting Two Birds with One Stone? *Cardiology*. 2020;145(5):311-20.
29. Seferović PM, Petrie MC, Filippatos GS, Anker SD, Rosano G, Bauersachs J, et al. Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2018;20(5):853-72.
30. Wilkinson MJ, Zadourian A, Taub PR. Heart Failure and Diabetes Mellitus: Defining the Problem and Exploring the Interrelationship. *Am J Cardiol*. 15 de diciembre de 2019;124 Suppl 1:S3-11.
31. Dal Canto E, Ceriello A, Rydén L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol*. 13 de noviembre de 2019;2047487319878371.
32. Esmatjes E, Vidal J. Repercusión cardíaca de la diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*. 1 de enero de 1998;51(8):661-70.
33. Fernández-Fúnez Á, Cabrera R, Hernández A, Requejo R, Rueda A, Fernández-Zamora F, et al. Disfunción diastólica del ventrículo izquierdo en jóvenes con diabetes mellitus tipo 1. Factores asociados. *Rev Esp Cardiol*. 1 de mayo de 2000;53(05):603-10.
34. Borghetti G, von Lewinski D, Eaton DM, Sourij H, Houser SR, Wallner M. Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control*. *Front Physiol*. 2018;9:1514.

35. Hernández DJC, García H, Quesada DMY, Salvato DA. Disfunción endotelial y diabetes mellitus. :20.
36. Dobre D, Nimade S, de Zeeuw D. Albuminuria in heart failure: what do we really know? *Curr Opin Cardiol.* marzo de 2009;24(2):148-54.
37. Ruilope LM. Relationship between cardiac hypertrophy and microalbuminuria. *Adv Exp Med Biol.* 1997;432:135-43.
38. Oellgaard J, Gæde P, Rossing P, Rørth R, Køber L, Parving HH, et al. Reduced risk of heart failure with intensified multifactorial intervention in individuals with type 2 diabetes and microalbuminuria: 21 years of follow-up in the randomised Steno-2 study. *Diabetologia.* 2018;61(8):1724-33.
39. Mehta A, Bhattacharya S, Estep J, Faiman C. Diabetes and Heart Failure: A Marriage of Inconvenience. *Clin Geriatr Med.* agosto de 2020;36(3):447-55.
40. Fitchett D, Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Hantel S, Salsali A, et al. Heart failure outcomes with empagliflozin in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: results of the EMPA-REG OUTCOME® trial. *Eur Heart J.* 14 de mayo de 2016;37(19):1526-34.
41. Lundbaek K. Diabetic angiopathy: a specific vascular disease. *Lancet Lond Engl.* 20 de febrero de 1954;266(6808):377-9.
42. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 8 de noviembre de 1972;30(6):595-602.
43. Lee WS, Kim J. Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going. *Korean J Intern Med.* mayo de 2017;32(3):404-21.
44. Lorenzo-Almorós A, Cepeda-Rodrigo JM, Lorenzo Ó. Diabetic cardiomyopathy. *Rev Clin Esp.* 24 de febrero de 2020;
45. Lee MMY, McMurray JJV, Lorenzo-Almorós A, Kristensen SL, Sattar N, Jhund PS, et al. Diabetic cardiomyopathy. *Heart Br Card Soc.* 2019;105(4):337-45.
46. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol.* 20 de febrero de 2020;
47. Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, Lavie CJ, Ventura H, Mukherjee D, et al. Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review. *Prog Cardiovasc Dis.* agosto de 2019;62(4):315-26.
48. Hu X, Bai T, Xu Z, Liu Q, Zheng Y, Cai L. Pathophysiological Fundamentals of Diabetic Cardiomyopathy. *Compr Physiol.* 16 de 2017;7(2):693-711.

49. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. abril de 2014;57(4):660-71.
50. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*. 16 de 2018;122(4):624-38.
51. Li M, Murabito A, Ghigo A, Hirsch E. PI3Ks in Diabetic Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol*. diciembre de 2017;70(6):422-9.
52. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. marzo de 2016;12(3):144-53.
53. Venardos K, De Jong KA, Elkamie M, Connor T, McGee SL. The PKD inhibitor CID755673 enhances cardiac function in diabetic db/db mice. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120934.
54. Plante E, Menaouar A, Danalache BA, Broderick TL, Jankowski M, Gutkowska J. Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice. *Diabetologia*. junio de 2014;57(6):1257-67.
55. Kanwal A, Nizami HL, Mallapudi S, Putcha UK, Mohan GK, Banerjee SK. Inhibition of SGLT1 abrogates preconditioning-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 de abril de 2016;472(2):392-8.
56. Stratmann B, Tschoepe D. Heart in diabetes: not only a macrovascular disease. *Diabetes Care*. mayo de 2011;34 Suppl 2:S138-144.
57. Montaigne D, Marechal X, Coisne A, Debry N, Modine T, Fayad G, et al. Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation*. 12 de agosto de 2014;130(7):554-64.
58. Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. abril de 2017;172:50-62.
59. Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol*. 10 de noviembre de 2009;54(20):1891-8.
60. Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1 de mayo de 2011;90(2):234-42.
61. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2014;78(2):300-6.

62. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(9):940-50.
63. Kovacic JC, Castellano JM, Farkouh ME, Fuster V. The relationships between cardiovascular disease and diabetes: focus on pathogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* marzo de 2014;43(1):41-57.
64. Knapp M, Tu X, Wu R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* enero de 2019;40(1):1-8.
65. Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M. Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* agosto de 1992;6(11):2905-14.
66. Williamson JR, Tilton RG, Chang K, Kilo C. Basement membrane abnormalities in diabetes mellitus: relationship to clinical microangiopathy. *Diabetes Metab Rev.* junio de 1988;4(4):339-70.
67. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb.* 1 de enero de 2018;25(1):27-39.
68. Arce LDD. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. :12.
69. Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol.* 2019;20:247-60.
70. Shah MS, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res.* 27 de mayo de 2016;118(11):1808-29.
71. Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2018;14(6):491-509.
72. Inzucchi SE, Zinman B, Wanner C, Ferrari R, Fitchett D, Hantel S, et al. SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk: proposed pathways and review of ongoing outcome trials. *Diab Vasc Dis Res.* marzo de 2015;12(2):90-100.
73. Lathief S, Inzucchi SE. Approach to diabetes management in patients with CVD. *Trends Cardiovasc Med.* febrero de 2016;26(2):165-79.
74. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Control and Complications Trial Research Group. J Pediatr.* agosto de 1994;125(2):177-88.
75. DCCT/EDIC research group. Effect of intensive diabetes treatment on albuminuria in type 1 diabetes: long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and

- Complications study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* octubre de 2014;2(10):793-800.
76. DCCT/EDIC Research Group, Aiello LP, Sun W, Das A, Gangaputra S, Kiss S, et al. Intensive diabetes therapy and ocular surgery in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 30 de abril de 2015;372(18):1722-33.
  77. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet Lond Engl.* 12 de septiembre de 1998;352(9131):854-65.
  78. 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. *Lancet Lond Engl.* 12 de septiembre de 1998;352(9131):837-53.
  79. Implications of the United kingdom prospective diabetes study - PubMed [Internet]. [citado 21 de julio de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12502617/>
  80. Goff DC, Gerstein HC, Ginsberg HN, Cushman WC, Margolis KL, Byington RP, et al. Prevention of cardiovascular disease in persons with type 2 diabetes mellitus: current knowledge and rationale for the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Am J Cardiol.* 18 de junio de 2007;99(12A):4i-20i.
  81. ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 12 de junio de 2008;358(24):2560-72.
  82. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 8 de enero de 2009;360(2):129-39.
  83. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet Lond Engl.* 05 de 2019;393(10166):31-9.
  84. Ghosh-Swaby OR, Goodman SG, Leiter LA, Cheng A, Connelly KA, Fitchett D, et al. Glucose-lowering drugs or strategies, atherosclerotic cardiovascular events, and heart failure in people with or at risk of type 2 diabetes: an updated systematic review and meta-analysis of randomised cardiovascular outcome trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(5):418-35.
  85. Schernthaner G, Karasik A, Abraitiené A, Ametov AS, Gaál Z, Gumprecht J, et al. Evidence from routine clinical practice: EMPRISE provides a new perspective on CVOTs. *Cardiovasc Diabetol [Internet].* 31 de agosto de

2019 [citado 21 de julio de 2020];18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6717330/>

86. Kosiborod M, Cavender MA, Fu AZ, Wilding JP, Khunti K, Holl RW, et al. Lower Risk of Heart Failure and Death in Patients Initiated on Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors Versus Other Glucose-Lowering Drugs. *Circulation*. 18 de julio de 2017;136(3):249-59.
87. Deedwania P, Acharya T. Cardiovascular Protection with Anti-hyperglycemic Agents. *Am J Cardiovasc Drugs Drugs Devices Interv*. junio de 2019;19(3):249-57.
88. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 26 de octubre de 2014;13:148.
89. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. SGLT inhibitors in management of diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. octubre de 2013;1(2):140-51.
90. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. junio de 2012;166(3):877-94.
91. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. noviembre de 2017;95:605-13.
92. Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artiles D, Bermúdez R, Clapés S. Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomédica*. 23 de mayo de 2016;36(2):230.
93. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9051426.
94. Arias-Díaz J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp*. abril de 2007;22(2):160-8.
95. ARAGÓN DM, OSPINA LF. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*. 2009;16(3):311-9.
96. Pogwizd SM, Bers DM. Rabbit models of heart disease. *Drug Discov Today Dis Models*. 2008;5(3):185-93.
97. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 01 de 2018;314(4):H812-38.
98. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. febrero de 2007;42(2):271-9.

99. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* enero de 2020;40(1):158-89.
100. Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Curr Heart Fail Rep.* septiembre de 2012;9(3):200-10.
101. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 17 de febrero de 2017;120(4):713-35.
102. Gesierich A, Niroomand F, Tiefenbacher CP. Role of human GTP cyclohydrolase I and its regulatory protein in tetrahydrobiopterin metabolism. *Basic Res Cardiol.* marzo de 2003;98(2):69-75.
103. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1656450.
104. Wu HE, Baumgardt SL, Fang J, Paterson M, Liu Y, Du J, et al. Cardiomyocyte GTP Cyclohydrolase 1 Protects the Heart Against Diabetic Cardiomyopathy. *Sci Rep.* 13 de 2016;6:27925.
105. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 21 de 2019;381(21):1995-2008.
106. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Khan MS, Marx N, Lam CSP, et al. Effect of Empagliflozin on Cardiovascular and Renal Outcomes in Patients With Heart Failure by Baseline Diabetes Status: Results From the EMPEROR-Reduced Trial. *Circulation.* 26 de enero de 2021;143(4):337-49.
107. Packer M, Butler J, Zannad F, Filippatos G, Ferreira JP, Pocock SJ, et al. Effect of Empagliflozin on Worsening Heart Failure Events in Patients with Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction: The EMPEROR-Preserved Trial. *Circulation.* 29 de agosto de 2021;
108. Anker SD, Butler J, Filippatos GS, Jamal W, Salsali A, Schnee J, et al. Evaluation of the effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure and a preserved ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Preserved Trial. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(10):1279-87.
109. Lin CH, Hsiao LW, Kuo YH, Shih CC. Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of Sulphurenic Acid, a Triterpenoid Compound from *Antrodia camphorata*, in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Int J Mol Sci.* 2 de octubre de 2019;20(19):E4897.
110. Asensio-Lopez MDC, Lax A, Fernandez Del Palacio MJ, Sassi Y, Hajjar RJ, Pascual-Figal DA. Pharmacological inhibition of the mitochondrial NADPH

- oxidase 4/PKC $\alpha$ /Gal-3 pathway reduces left ventricular fibrosis following myocardial infarction. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2018;199:4-23.
111. Banerjee I, Carrion K, Serrano R, Dyo J, Sasik R, Lund S, et al. Cyclic stretch of embryonic cardiomyocytes increases proliferation, growth, and expression while repressing Tgf- $\beta$  signaling. *J Mol Cell Cardiol.* febrero de 2015;79:133-44.
  112. Asensio-Lopez MC, Lax A, Fernandez Del Palacio MJ, Sassi Y, Hajjar RJ, Januzzi JL, et al. Yin-Yang 1 transcription factor modulates ST2 expression during adverse cardiac remodeling post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;130:216-33.
  113. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 1994;32:5-8.
  114. Bailey J, Shaw A, Fischer R, Ryan BJ, Kessler BM, McCullagh J, et al. A novel role for endothelial tetrahydrobiopterin in mitochondrial redox balance. *Free Radic Biol Med.* 2017;104:214-25.
  115. Nar H, Huber R, Auerbach G, Fischer M, Hösl C, Ritz H, et al. Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 de diciembre de 1995;92(26):12120-5.
  116. Neal B, Perkovic V, Matthews DR. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 23 de 2017;377(21):2099.
  117. Verma S, Wanner C, Zwiener I, Ofstad AP, George JT, Fitchett D, et al. Influence of Microvascular Disease on Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 04 de 2019;73(21):2780-2.
  118. Rådholm K, Figtree G, Perkovic V, Solomon SD, Mahaffey KW, de Zeeuw D, et al. Canagliflozin and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus: Results From the CANVAS Program. *Circulation.* 31 de 2018;138(5):458-68.
  119. Byrne NJ, Parajuli N, Levasseur JL, Boisvenue J, Beker DL, Masson G, et al. Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci.* agosto de 2017;2(4):347-54.
  120. Connelly KA, Zhang Y, Visram A, Advani A, Batchu SN, Desjardins JF, et al. Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Basic Transl Sci.* febrero de 2019;4(1):27-37.
  121. Zannad F, Ferreira JP, Pocock SJ, Anker SD, Butler J, Filippatos G, et al. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials. *Lancet Lond Engl.* 28 de agosto de 2020;

122. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med*. 29 de agosto de 2020;
123. Williams DM, Evans M. Are SGLT-2 Inhibitors the Future of Heart Failure Treatment? The EMPEROR-Preserved and EMPEROR-Reduced Trials. *Diabetes Ther Res Treat Educ Diabetes Relat Disord*. septiembre de 2020;11(9):1925-34.
124. Damman K, Beusekamp JC, Boorsma EM, Swart HP, Smilde TDJ, Elvan A, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre pilot study on the effects of empagliflozin on clinical outcomes in patients with acute decompensated heart failure (EMPA-RESPONSE-AHF). *Eur J Heart Fail*. abril de 2020;22(4):713-22.
125. Jensen J, Omar M, Kistorp C, Poulsen MK, Tuxen C, Gustafsson I, et al. Empagliflozin in heart failure patients with reduced ejection fraction: a randomized clinical trial (Empire HF). *Trials*. 21 de junio de 2019;20(1):374.
126. Abraham WT, Ponikowski P, Brueckmann M, Zeller C, Macesic H, Peil B, et al. Rationale and design of the EMPERIAL-Preserved and EMPERIAL-Reduced trials of empagliflozin in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(7):932-42.
127. Seferović PM, Coats AJS, Ponikowski P, Filippatos G, Huelsmann M, Jhund PS, et al. European Society of Cardiology/Heart Failure Association position paper on the role and safety of new glucose-lowering drugs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. febrero de 2020;22(2):196-213.
128. Yurista SR, Silljé HHW, Oberdorf-Maass SU, Schouten EM, Pavez Giani MG, Hillebrands JL, et al. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(7):862-73.
129. Iborra-Egea O, Santiago-Vacas E, Yurista SR, Lupón J, Packer M, Heymans S, et al. Unraveling the Molecular Mechanism of Action of Empagliflozin in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction With or Without Diabetes. *JACC Basic Transl Sci*. noviembre de 2019;4(7):831-40.
130. Mustroph J, Wagemann O, Lucht CM, Trum M, Hammer KP, Sag CM, et al. Empagliflozin reduces Ca/calmodulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes. *ESC Heart Fail*. 2018;5(4):642-8.
131. Andreadou I, Efentakis P, Balafas E, Togliatto G, Davos CH, Varela A, et al. Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects. *Front Physiol*. 2017;8:1077.

132. Zelniker TA, Braunwald E. Cardiac and Renal Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in Diabetes: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 09 de 2018;72(15):1845-55.
133. Ng KM, Lau YM, Dhandhanian V, Cai ZJ, Lee YK, Lai WH, et al. Empagliflozin Ameliorates High Glucose Induced-Cardiac Dysfunction in Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Sci Rep.* 05 de 2018;8(1):14872.
134. Li P, Yin YL, Guo T, Sun XY, Ma H, Zhu ML, et al. Inhibition of Aberrant MicroRNA-133a Expression in Endothelial Cells by Statin Prevents Endothelial Dysfunction by Targeting GTP Cyclohydrolase 1 in Vivo. *Circulation.* 29 de noviembre de 2016;134(22):1752-65.
135. Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, et al. Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem.* 9 de enero de 2009;284(2):1136-44.
136. Liu Y, Baumgardt SL, Fang J, Shi Y, Qiao S, Bosnjak ZJ, et al. Transgenic overexpression of GTP cyclohydrolase 1 in cardiomyocytes ameliorates post-infarction cardiac remodeling. *Sci Rep.* 08 de 2017;7(1):3093.
137. Sharma S, Sun X, Kumar S, Rafikov R, Aramburo A, Kalkan G, et al. Preserving mitochondrial function prevents the proteasomal degradation of GTP cyclohydrolase I. *Free Radic Biol Med.* 15 de julio de 2012;53(2):216-29.
138. Lim VG, Bell RM, Arjun S, Kolatsi-Joannou M, Long DA, Yellon DM. SGLT2 Inhibitor, Canagliflozin, Attenuates Myocardial Infarction in the Diabetic and Nondiabetic Heart. *JACC Basic Transl Sci.* febrero de 2019;4(1):15-26.
139. Chuaiphichai S, McNeill E, Douglas G, Crabtree MJ, Bendall JK, Hale AB, et al. Cell-autonomous role of endothelial GTP cyclohydrolase 1 and tetrahydrobiopterin in blood pressure regulation. *Hypertens Dallas Tex* 1979. septiembre de 2014;64(3):530-40.
140. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes.* abril de 2002;51(4):1076-82.
141. Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, Piegari E, Nappo F, Esposito K, et al. Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. *Diabetologia.* agosto de 2002;45(8):1172-81.
142. Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold JM. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 7 de agosto de 2001;104(6):700-4.

143. Eiserich JP, Estévez AG, Bamberg TV, Ye YZ, Chumley PH, Beckman JS, et al. Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de mayo de 1999;96(11):6365-70.
144. Lytvyn Y, Bjornstad P, Udell JA, Lovshin JA, Cherney DZI. Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibition in Heart Failure: Potential Mechanisms, Clinical Applications, and Summary of Clinical Trials. *Circulation*. 24 de octubre de 2017;136(17):1643-58.
145. Striepe K, Jumar A, Ott C, Karg MV, Schneider MP, Kannenkeril D, et al. Effects of the Selective Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin on Vascular Function and Central Hemodynamics in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*. 19 de 2017;136(12):1167-9.
146. Böhm M, Slawik J, Brueckmann M, Mattheus M, George JT, Ofstad AP, et al. Efficacy of empagliflozin on heart failure and renal outcomes in patients with atrial fibrillation: data from the EMPA-REG OUTCOME trial. *Eur J Heart Fail*. enero de 2020;22(1):126-35.
147. Ghezzi C, Yu AS, Hirayama BA, Kepe V, Liu J, Scafoglio C, et al. Dapagliflozin Binds Specifically to Sodium-Glucose Cotransporter 2 in the Proximal Renal Tubule. *J Am Soc Nephrol JASN*. marzo de 2017;28(3):802-10.
148. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, Mudaliar H, Forbes J, et al. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells--renoprotection in diabetic nephropathy? *PloS One*. 2013;8(2):e54442.
149. Packer M. Autophagy-dependent and -independent modulation of oxidative and organellar stress in the diabetic heart by glucose-lowering drugs. *Cardiovasc Diabetol*. 13 de mayo de 2020;19(1):62.



# **15. INDICE DE TABLAS**



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** CVOTs en Diabetes Mellitus y su beneficio cardiovascular. Datos expresados en Hazard Ratio, comparado con grupo control. No (No diferencias), R (reducido), I (Incrementado), es el efecto del fármaco. El porcentaje de la última columna (%), se refiere a la prevalencia previa de IC En los pacientes del Ensayo Clínico. ND= no disponible, MACE= Evento cardiovascular mayor. HIC= Hospitalización por IC. MACE IC= MACE en la cohorte de IC. Adaptado de Cattadori G. y Col.

FAMILIA TERAPÉUTICA	ENSAYO	FÁRMACO	MACE	HIC Prevención primaria	MACE IC Prevención secundaria
a-GLP1	ELIXA	Lixisenatida	No (1.02)	No (0.96)	22.4% No (ND)
	LEADER	Liraglutida	R (0.87)	No (0.87)	18.2% No (0.94)
	SUSTAIN-6	Semaglutida	R (0.74)	No (1.11)	23.6% No (1.03)
	EXSCEL	Exenatida	No (0.91)	No (0.94)	16.2% No (0.97)
	REWIND	Dulaglutida	R (0.88)	No (0.93)	8.6% No (ND)
	HARMONY OUTCOMES	Albiglutida	R (0.78)	No (0.85)	R (0.7)
i-SGLT2	EMPAREG OUTCOMES	Empaglifozina	R (0.86)	R (0.86)	R (0.71)
	CANVAS PROGRAM	Canaglifozina	R (0.86)	R (0.86)	14.4% No (0.8)
	DECLARE-TIMI 58	Dapaglifozina	No (0.93)	No (0.93)	10% No (1.01)
	CREDESCENCE	Canaglifozina	R (0.70)	R (0.70)	14.8% No (0.89)

**Tabla 2:** Secuencias de cebadores específicos de genes utilizadas para PCR cuantitativa en tiempo real. Col, colágeno; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GCH1, ciclohidrolasa GTP cardíaca 1; Myh, cadena pesada de miosina; Nppa, precursor de péptido natriurético A.

Gen	Cebador Forward primer (5'→3')	Cebador Reverse primer (5'→3')
Col1a1	CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
Col3a1	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTA	CAGAGGTGCCATCCAGAGTT
GCH1	CCAGGTGCAGCAATGGGTTC	TTCAACCACTACCCCGACTC
Myh6	GCCCAGTACCTCCGAAAGTC	GCCTTAACATACTCCTCCTTGTC
Myh7	ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA	TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG
Nppa	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	GGGGGCATGACCTCATCTT

**Tabla 3:** Resumen de los Anticuerpos utilizados en el estudio.

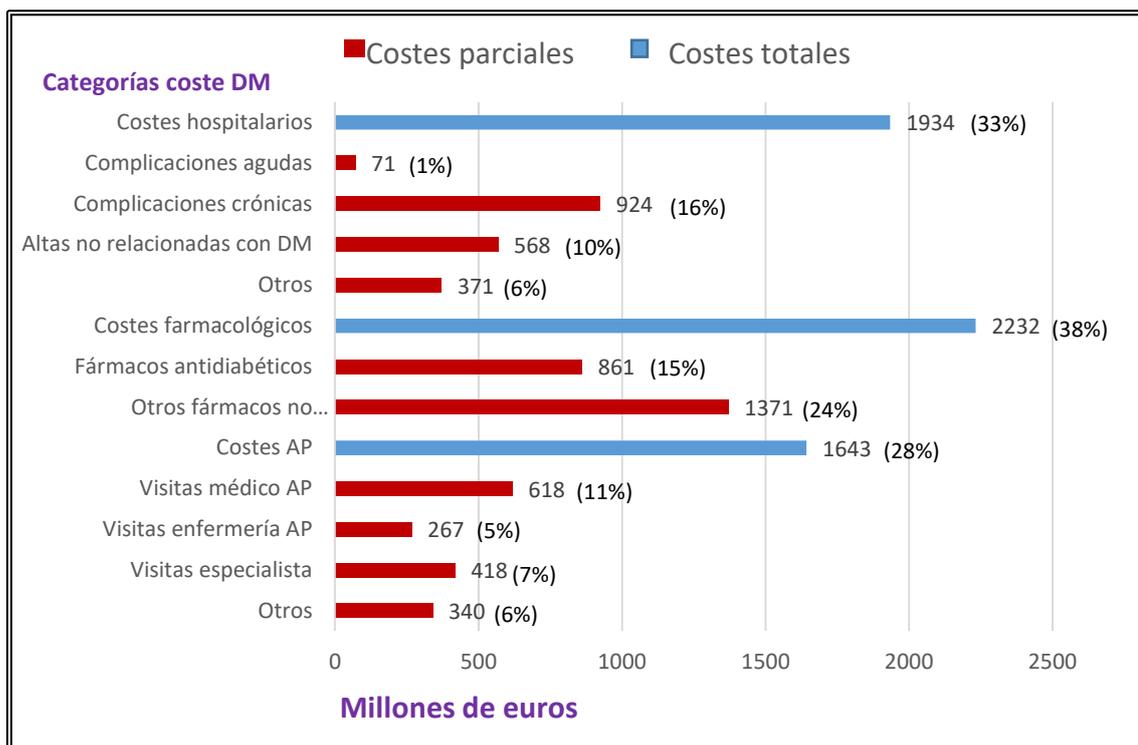
Molécula	Dilución	Fuente	Referencia
GCH1	1:500	Abcam	ab236387
Phospho-enos(Ser1177)	1:1000	Cell Signaling	9570
eNOS	1.500	Cell Signaling	9572
Phospho-nNOS(Ser1417)	1:1000	Abcam	ab90443
nNOS	1:500	Cell Signaling	4234
iNOS	1:1000	R&D Systems	MAB9502
GADPH	1:5000	Merck	G8795

# **16. ÍNDICE DE FIGURAS**

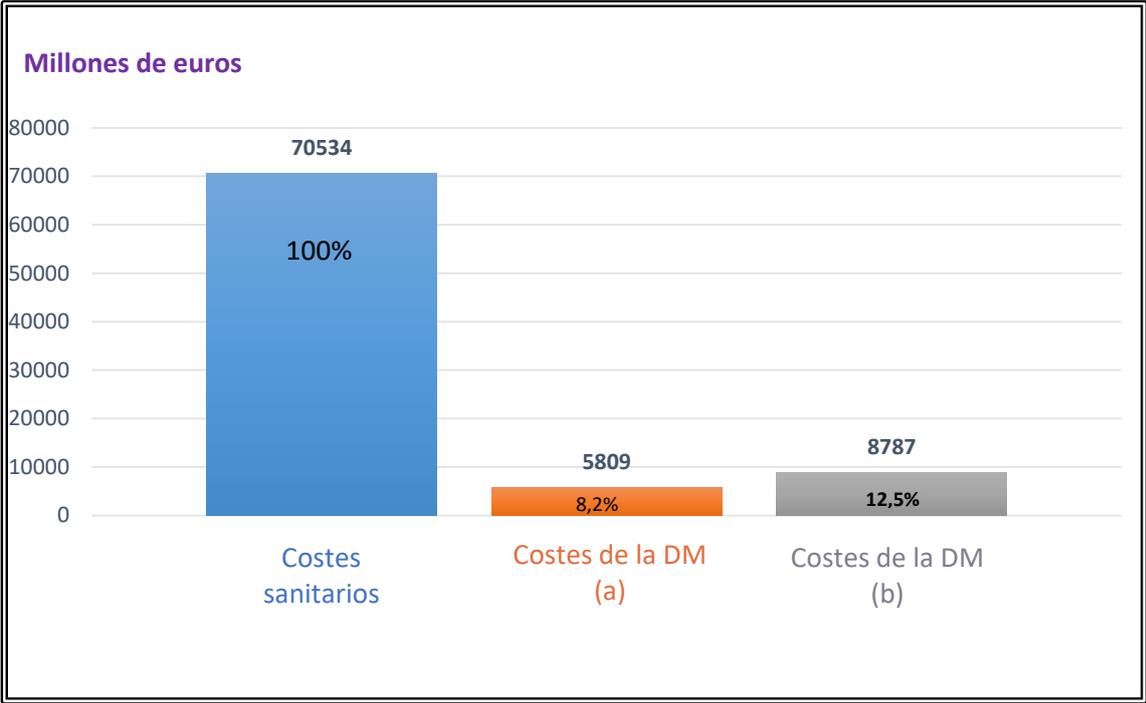


## ÍNDICE DE FIGURAS

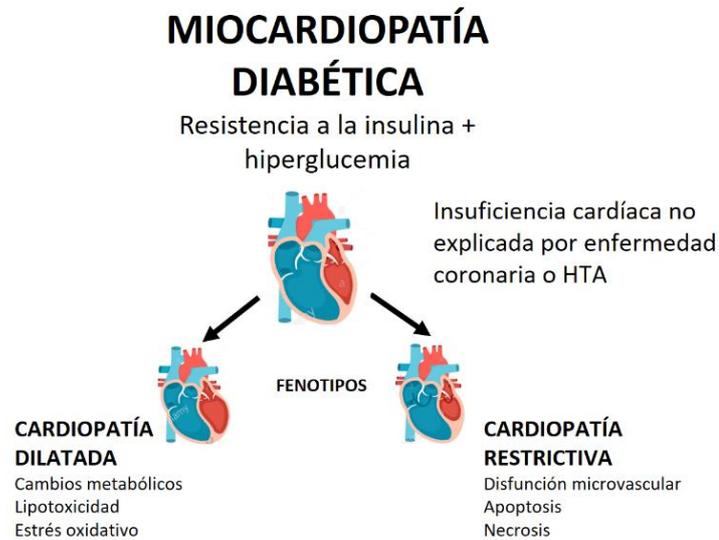
**Figura 1:** Costes directos relacionados con la diabetes mellitus y sus complicaciones (% sobre el total). Estudio SECCAID. C Crespo y col.



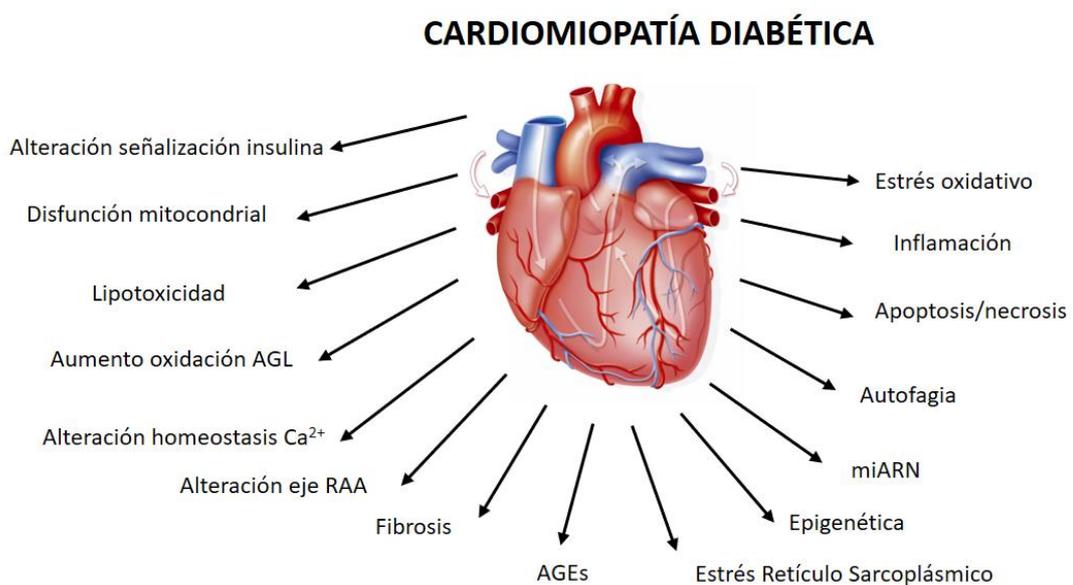
**Figura 2:** Impacto de la DM en el gasto sanitario global español. Millones de euros (% sobre el total). DM: diabetes mellitus. a) Considerando prevalencia diagnosticada DM2 7,8%, 90% de la prevalencia total diagnosticada de DM. b) Considerando prevalencia total DM2 13,8%, 90% de la prevalencia total de DM. Estudio SECCAID. C Crespo y col.



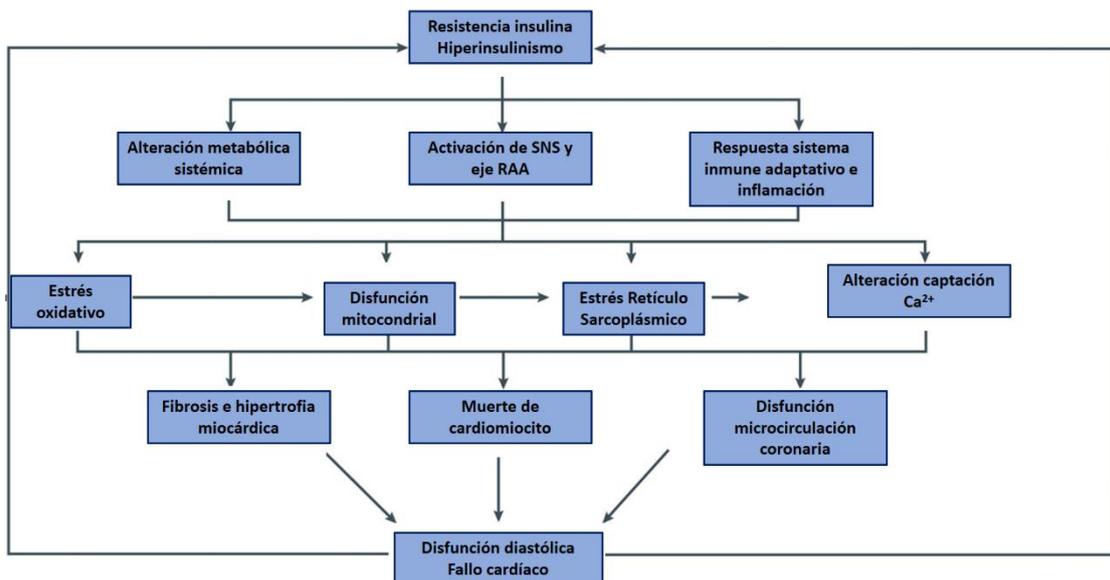
**Figura 3:** Mecanismos responsables del remodelado cardiaco, en los fenotipos restrictivo y dilatado. Adaptado de Saldarriaga-Giraldo y Col.



**Figura 4:** Representación esquemática de los múltiples mecanismos potenciales que han sido implicados en la fisiopatología de la miocardiopatía diabética. AGL: ácidos grasos libres. RAA: Renina-Angiotensina-Aldosterona. AGEs: Productos finales de glicación avanzada. miARN: micro ARN no codificantes. Adaptado de Bugger H y Col.



**Figura 5:** Desarrollo y progresión de la miocardiopatía diabética. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia aumentan los trastornos metabólicos sistémicos, activan el SNS (Sistema Nervioso Simpático), el eje Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA), lo que genera estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés del retículo sarcoplásmico y alteración de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ . Estos efectos resultan en fibrosis cardíaca, hipertrofia, muerte de cardiomiocitos, disfunción de la microcirculación coronaria y eventualmente insuficiencia cardíaca. Además, estos cambios fisiopatológicos en los cardiomiocitos subyacen a los factores de riesgo de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, lo que puede resultar en un círculo vicioso. Adaptado de Hu X y Col.



**Figura 6:** Flujo del  $\text{Ca}^{2+}$  en el cardiomiocito. Captación en el Túbulo-T, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra al citoplasma a través de los canales L- $\text{Ca}^{2+}$  tras la despolarización del sarcolema, lo que desencadena la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, mediado por los receptores de rianodina (RyR). Difusión a través del espacio citosólico para alcanzar las proteínas contráctiles. Al unirse a la troponina C, se desencadena el deslizamiento de los filamentos delgados y gruesos y la contracción miocárdica.  $\text{Ca}^{2+}$  regresa a los niveles diastólicos por la activación de la bomba SERCA2a. La flecha negra indica la regulación descendente de transportadores/intercambiadores específicos en la miocardiopatía diabética. Figura obtenida de Falcao-Pires y Col.

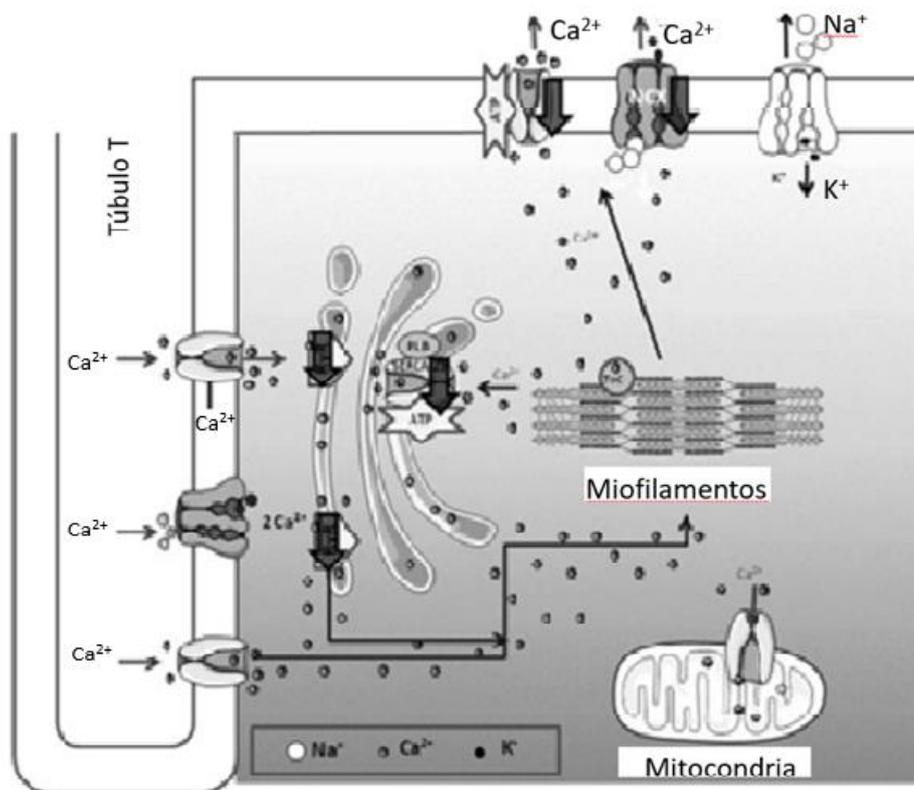
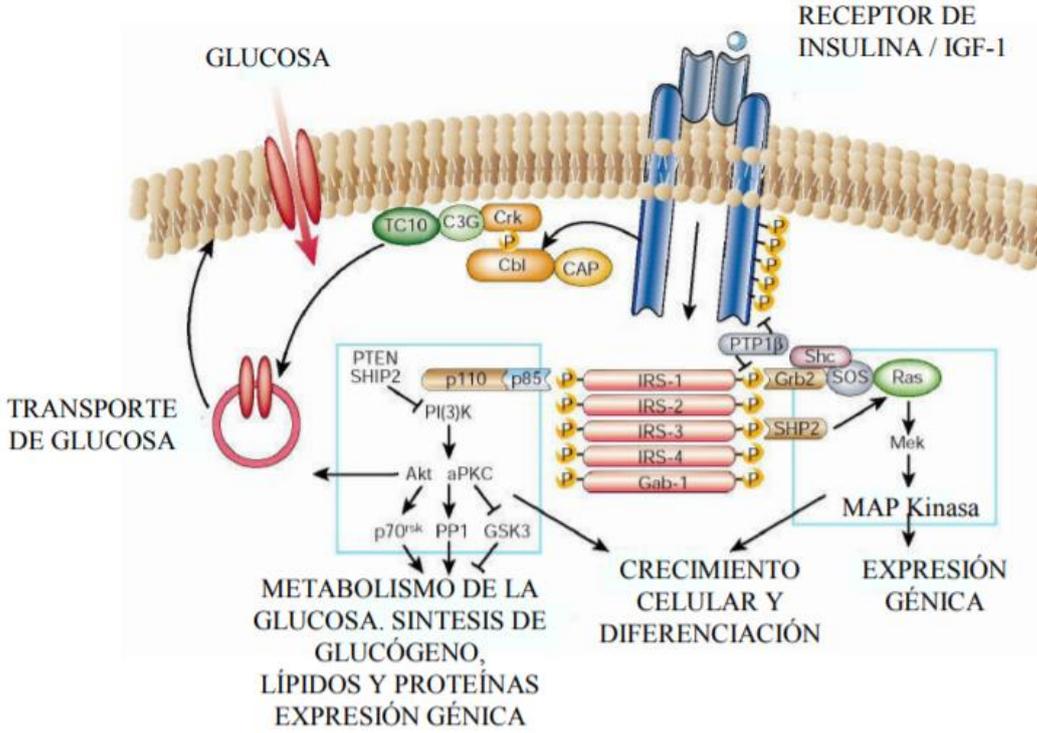
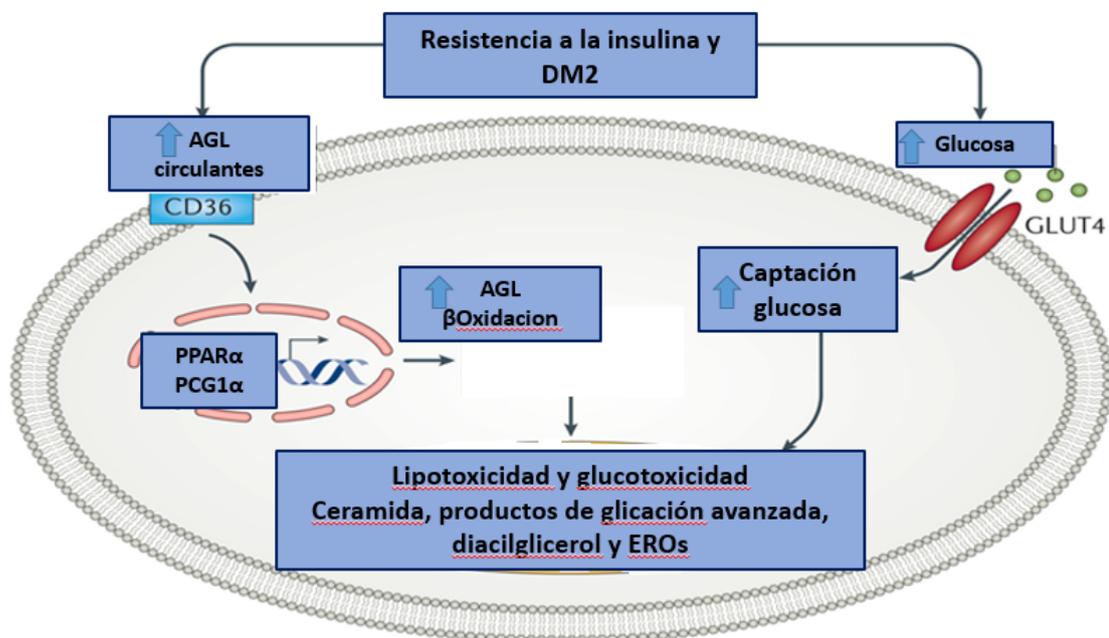


Figura 7: Vías de señalización de la insulina. Adaptado de Saltiel y Col.



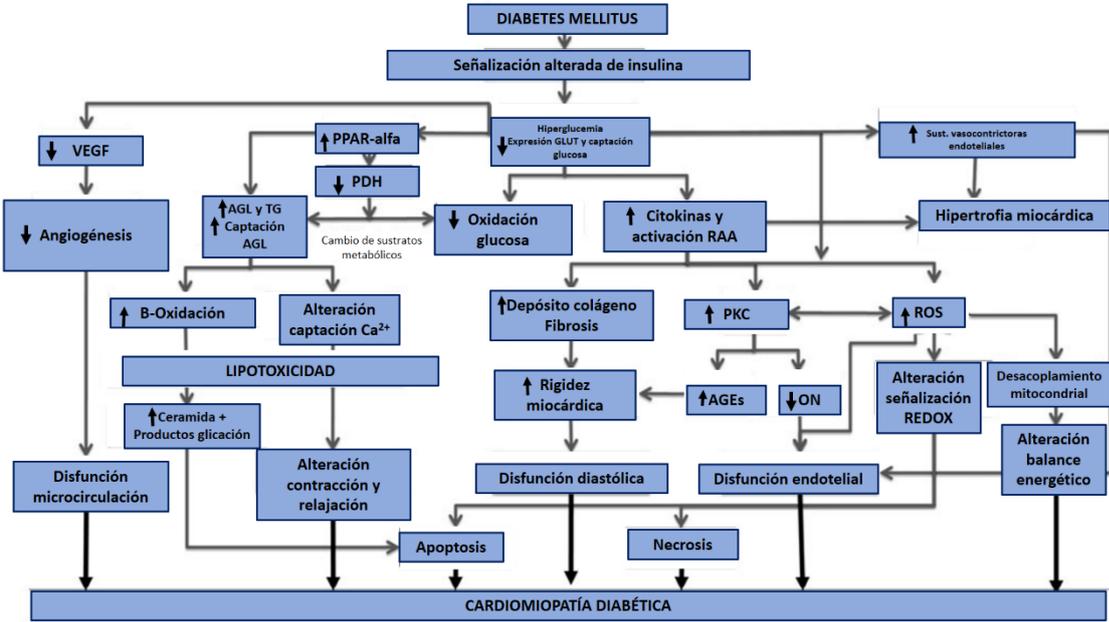
**Figura 8:** La RI y la DM2 conllevan una función metabólica deletérea en el cardiomiocito. En DM2, la expresión de PPAR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  cardíacos aumenta, lo que mejora la transcripción de proteínas que controlan la absorción y oxidación de ácidos grasos libres, por aumento del CD36. La glucosa es un sustrato más eficiente que los ácidos grasos libres, pero en este contexto se produce un cambio metabólico cardíaco de glucosa a ácidos grasos, lo que disminuye la eficiencia cardíaca. PPAR $\alpha$ : peroxisoma receptor activador de proliferador- $\alpha$ ; PGC-1 $\alpha$ : receptor activado por proliferador de peroxisoma; EROs: especies reactivas de oxígeno. AGL: ácidos grasos libres. Imagen obtenida de Jia G y Col.



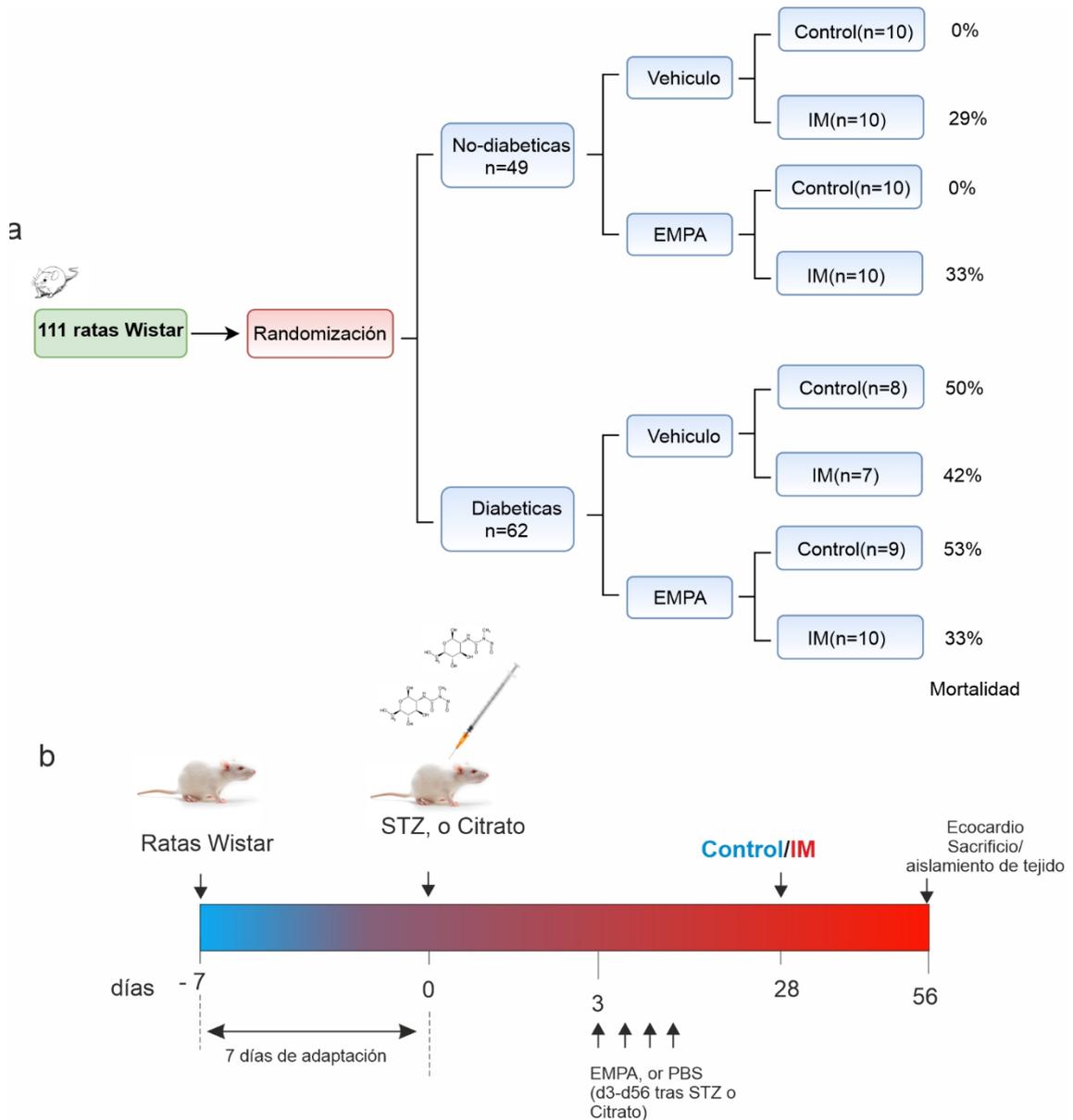
**Figura 9:** Tabla resumen de la fisiopatología en la miocardiopatía diabética.

VEGF: Factor de crecimiento endotelio vascular. PDH: Piruvato deshidrogenasa.

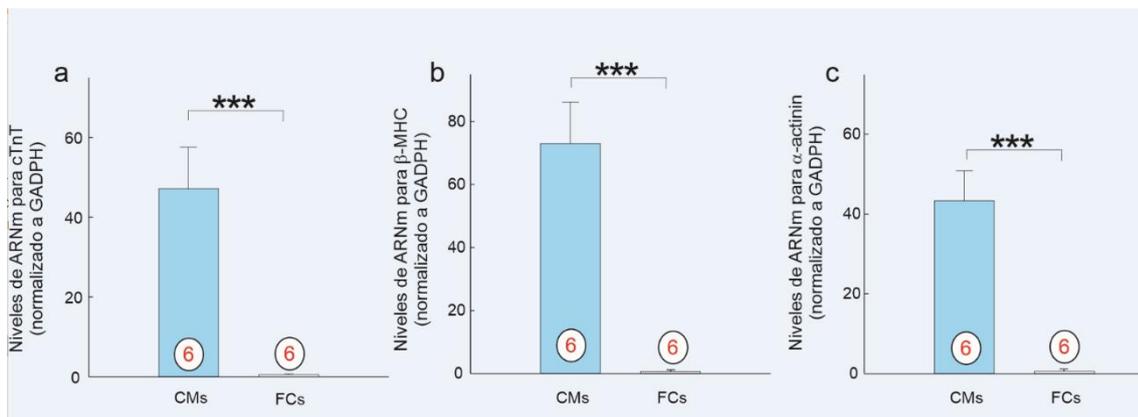
PKC: Proteína Cinasa C. Adaptado de Falcao-Pires y Col.



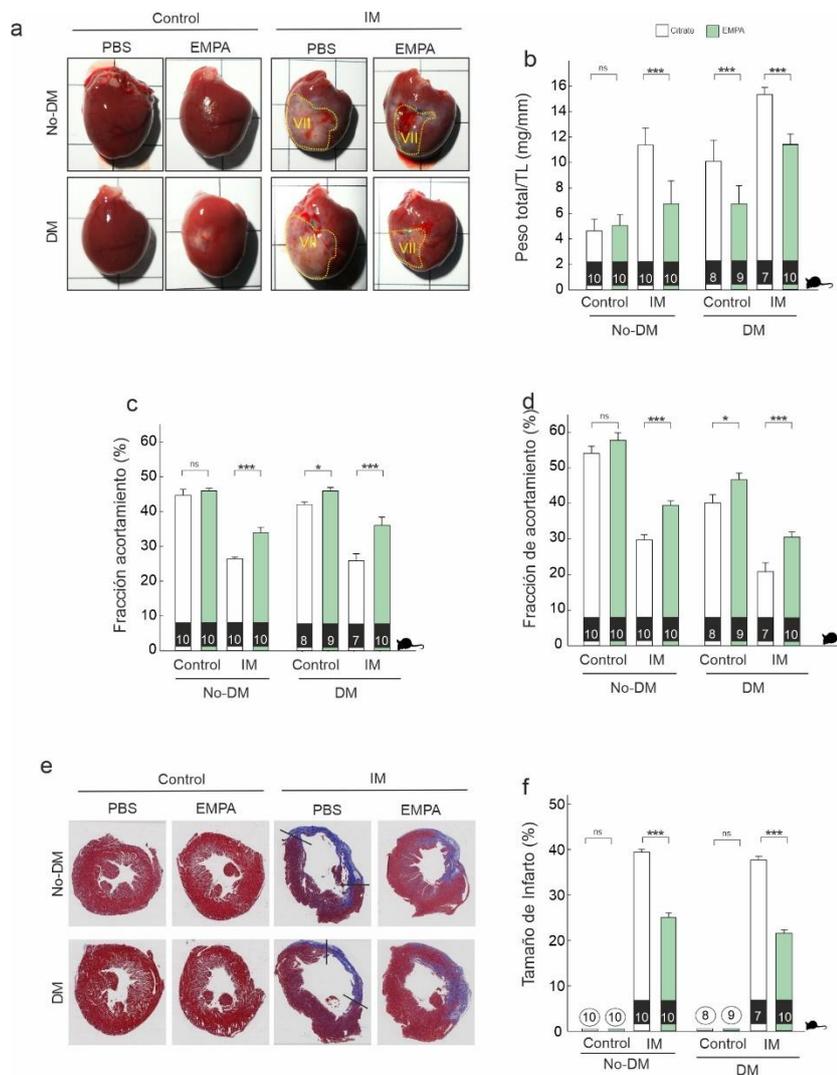
**Figura 10:** Diseño experimental. (a) Diagrama de flujo del estudio. (b) Esquema representativo del diseño experimental; el intervalo de tiempo donde las ratas fueron tratadas con EMPA se muestra en rojo. EMPA: empagliflozina; IM: infarto de miocardio; STZ: estreptozotocina; Vehículo: placebo; Control: Cirugía simulada; IM: Infarto miocárdio.



**Figura 11:** Pureza de los cardiomiocitos primarios. (a-c) Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de c-TnT, beta-MHC y alfa-actinina de miocitos cardíacos (CM) y fibroblastos (FC) del corazón de C57BL6/J. Los números rojos representan cuántos experimentos independientes se realizaron por grupo (n = 6). \*\*\* p <0,001 frente a fibroblastos cardíacos. c-TnT: troponina T cardíaca; beta-MHC: cadena pesada de miosina beta-cardíaca.

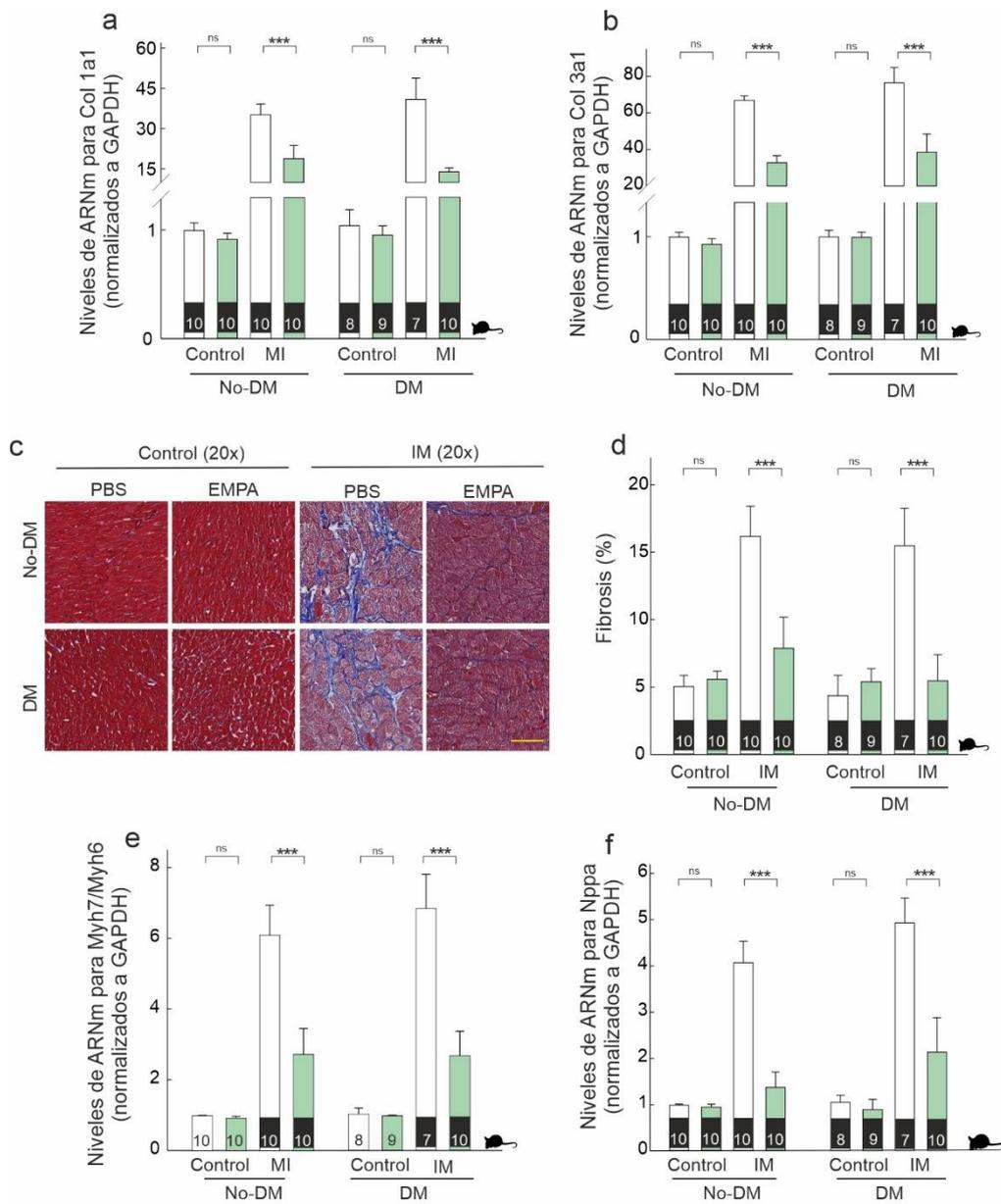


**Figura 12:** La terapia con empagliflozina mejora la remodelación cardíaca. (a) Imágenes representativas de todo el corazón, de corazones infartados, 4 semanas después de la cirugía. (b) Relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (VI/TL (peso del VI/longitud de la tibia)). (c, d) Análisis ecocardiográfico de fracción de acortamiento y fracción de eyección. (e, f) Izquierda; Secciones representativas de histología transversal del miocardio teñido con la tinción tricromica de Masson, de los grupos indicados tomados para las mediciones de tamaño de infarto (fijación de tejido 4 semanas después del IM). Las áreas ricas en colágeno (tejido cicatricial) están coloreadas en azul y el miocardio sano en rojo. Barra de escala: 0,5 cm. (Derecha). Cuantificación del tamaño del infarto. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . En la parte inferior de cada barra, número de animales analizados por grupo.

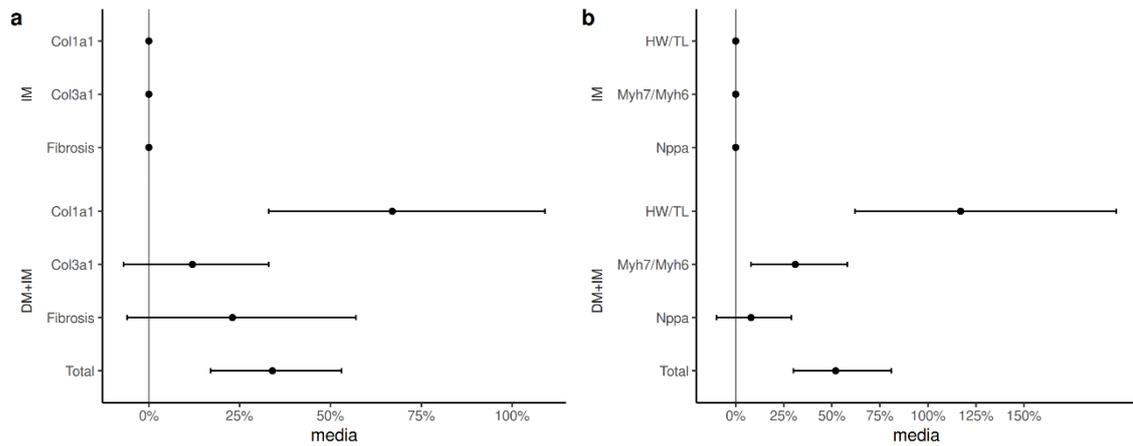


**Figura 13:** La terapia con empagliflozina previene la fibrosis y la hipertrofia.

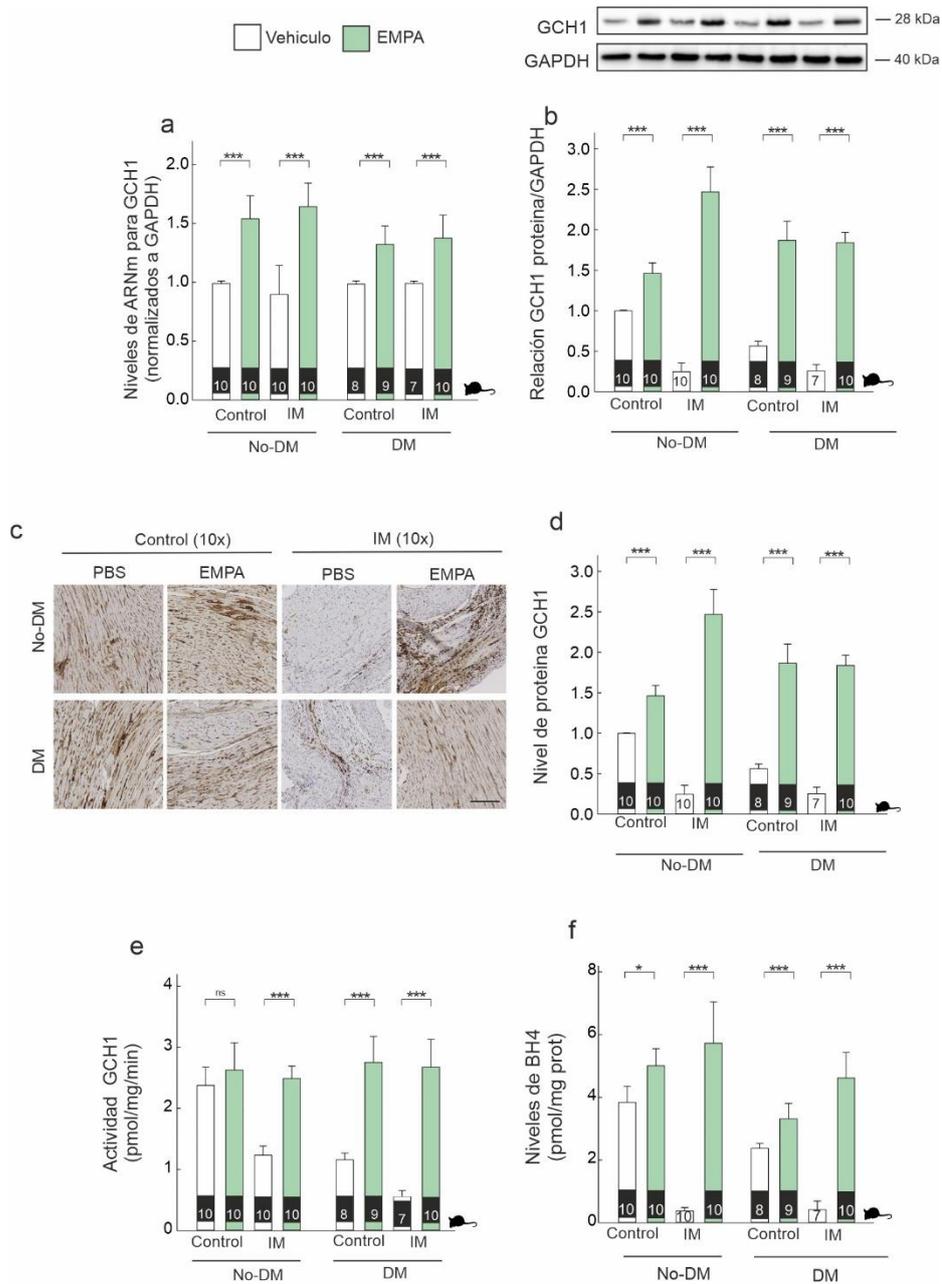
(a, b) Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de Col1a1 y Col3a1. (c) Secciones representativas del VI teñidas con Masson; Barras de escala: 25  $\mu$ m. (d) Colágenos asociados a fibrosis. (e, f) Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de la relación Myh7/Myh6 y Nppa. \*\*\* p <0,001.



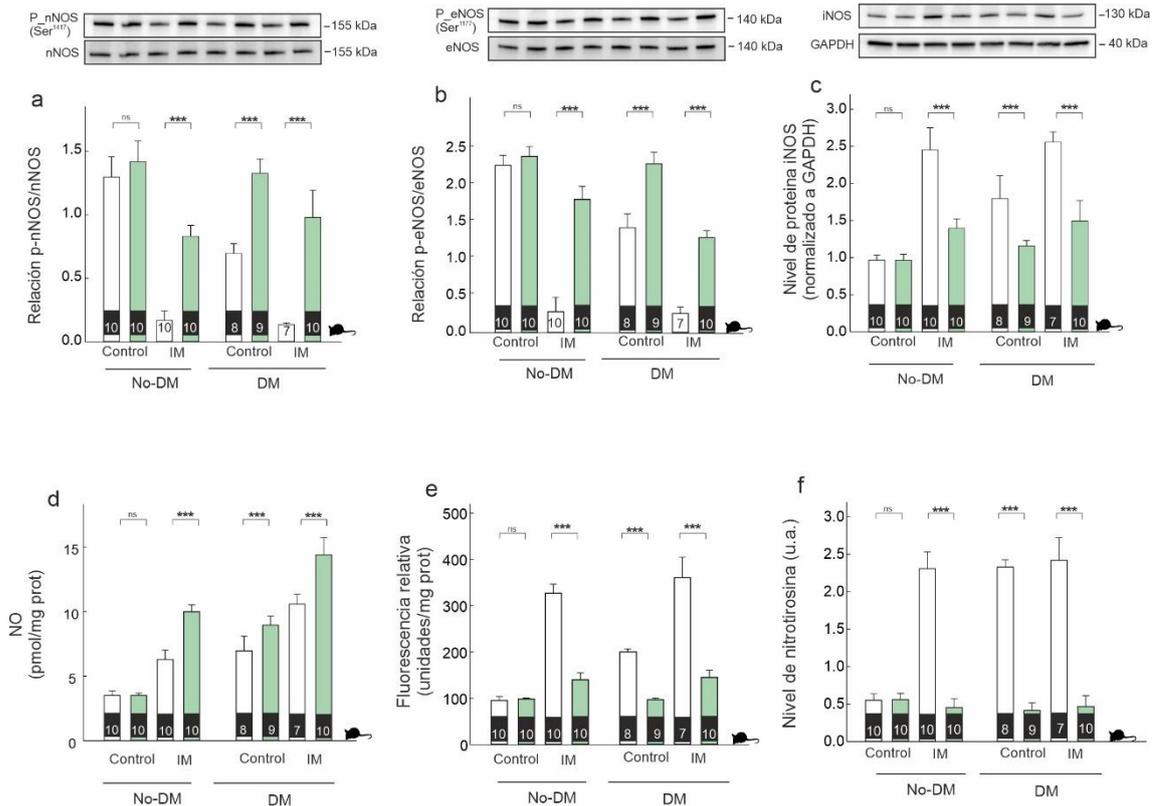
**Figura 14:** Efecto cardioprotector de la empagliflozina y análisis estadístico comparativo. Los puntos representan incrementos medios en porcentaje en el grupo infartado diabético respecto del no diabético y el error excluye los IC del 95%. a) Marcadores de fibrosis. b) Marcadores de hipertrofia cardíaca.



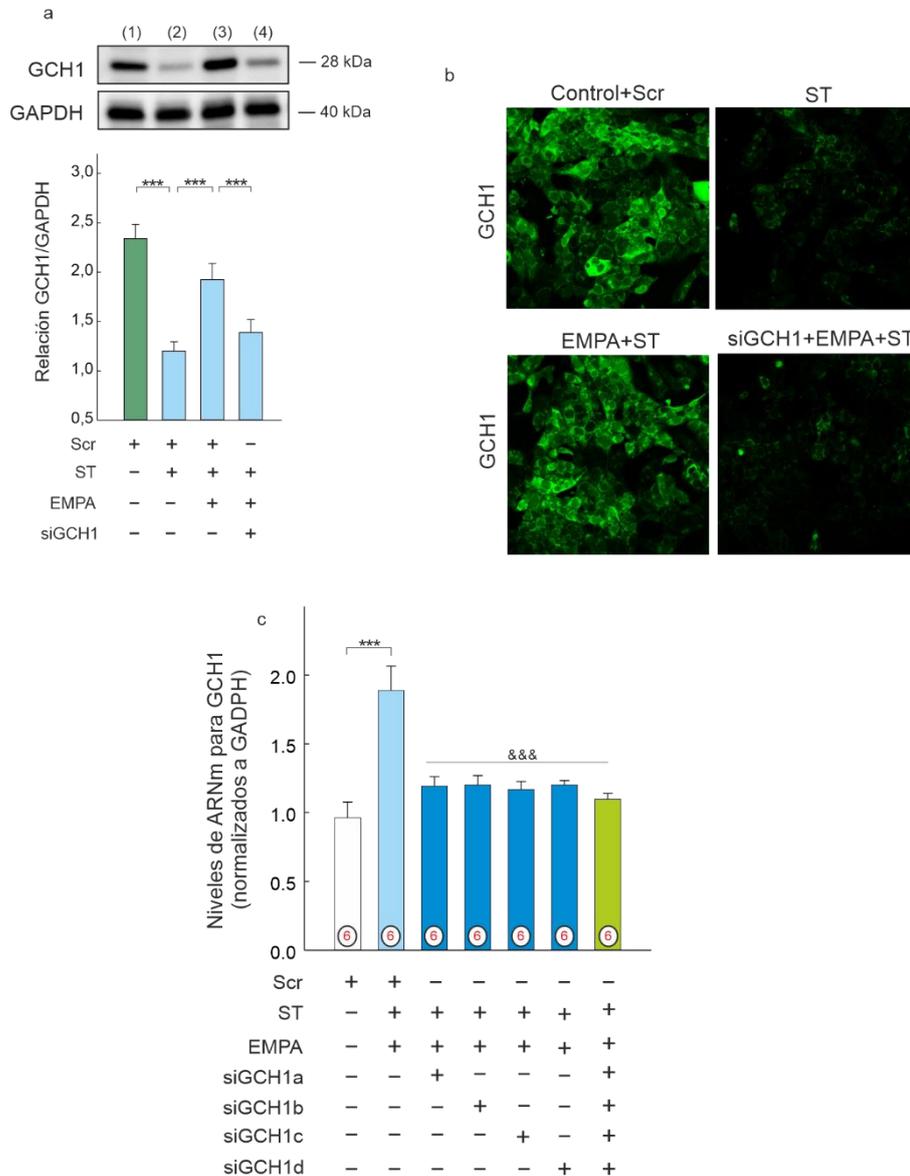
**Figura 15:** Empagliflozina modula los niveles de ARNm y proteína de cGCH1. (a) Expresión de ARNm cardíaco de cGCH1. (b) Análisis de transferencia Western representativo de cGCH1 en tejido de la zona fronteriza y análisis cuantitativo. (c-d) Tinción inmunohistoquímica de cGCH1 en la zona fronteriza; Barra de escala: 50  $\mu$ m. (e) Actividad cardíaca de GCH1. (f) Niveles de tetrahidrobiopterina. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



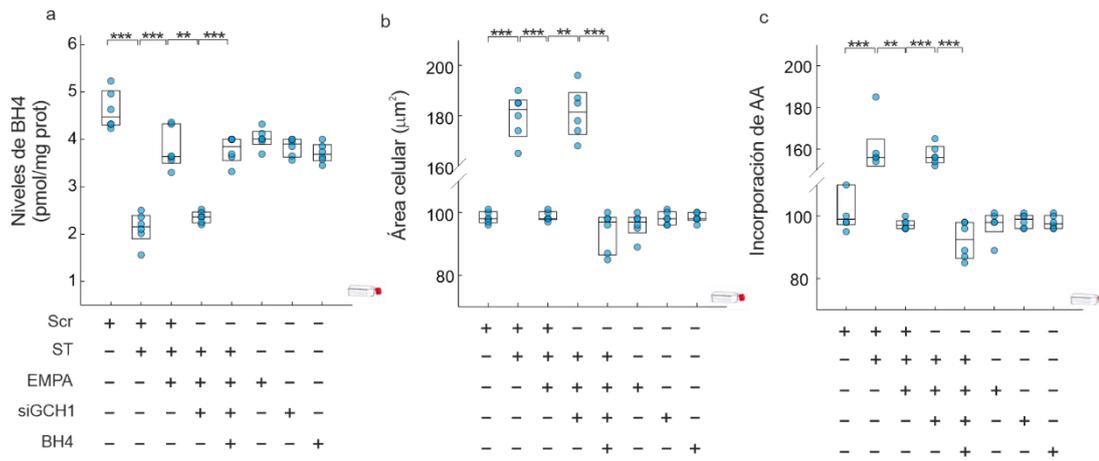
**Figura 16:** Empagliflozina modula la actividad de NOS. \*\*\*  $p < 0,001$ . (a) Bandas de western blot representativas que muestran la activación de nNOS. (b) Bandas de western blot representativas que muestran la activación de eNOS. (c) Bandas de western blot representativas que muestran la modulación de iNOS. (d) Niveles de NO. (e) Niveles de  $O_2^-$ . (f) Niveles de nitrotirosina.



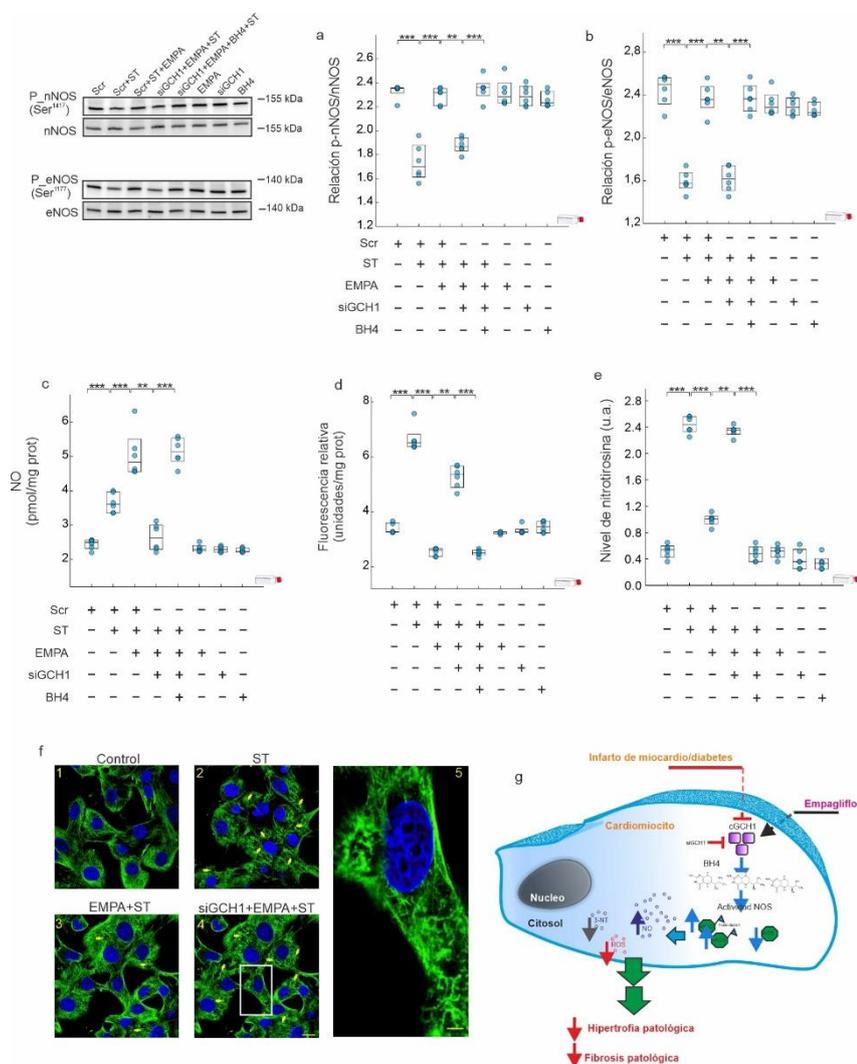
**Figura 17:** Silenciación efectiva de GCH1. (a) Análisis de transferencia western representativo de GCH1; (Línea 1: Scramble; Línea 2: Scramble + Strain; Línea 3: Scramble + Strain + EMPA; Línea 4: Strain + EMPA + siGCH1). (b) Imágenes de microscopía confocal después del análisis de inmunofluorescencia realizado con cardiomiocitos primarios que expresan GCH1 (verde). (c) Los cardiomiocitos se preincubaron con scramble siRNA (scr), con una combinación de cuatro siRNAs para GCH1 (siRNA GCH1\_a + b + c + d), o siRNAs individuales antes de la inducción de la tensión biomecánica durante 4 horas. La expresión de ARNm de GCH1 se analizó por RT-PCR cuantitativa. Los números rojos representan cuántos experimentos independientes se realizaron por grupo (n = 6). Barra de escala: 50  $\mu$ m. ### p <0.001 vs scr; &&& p <0.001 vs Scr + EMPA + cepa biomecánica. Scr: Scramble; ST: tensión.



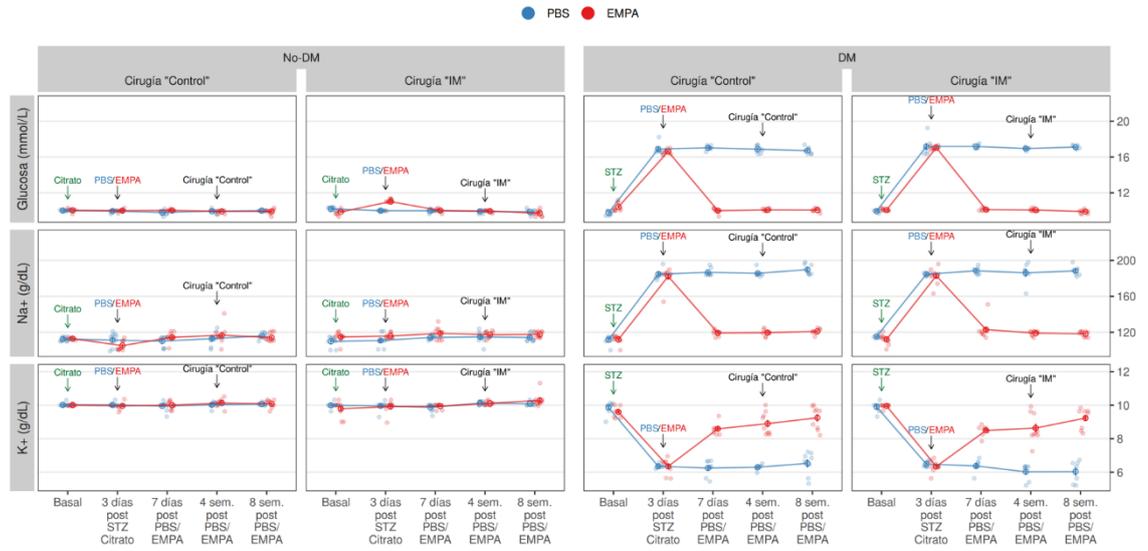
**Figura 18:** Empagliflozina previene la hipertrofia cardíaca. (a) Niveles de BH4. (b) Análisis cuantitativo de las mediciones del tamaño celular in vitro de cardiomiocitos adultos. (c) Captación de leucina en cardiomiocitos. Todas las cuantificaciones derivan de seis experimentos independientes/grupo. Los resultados se muestran como diagramas de dispersión y se resumen con diagramas de caja. \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001.



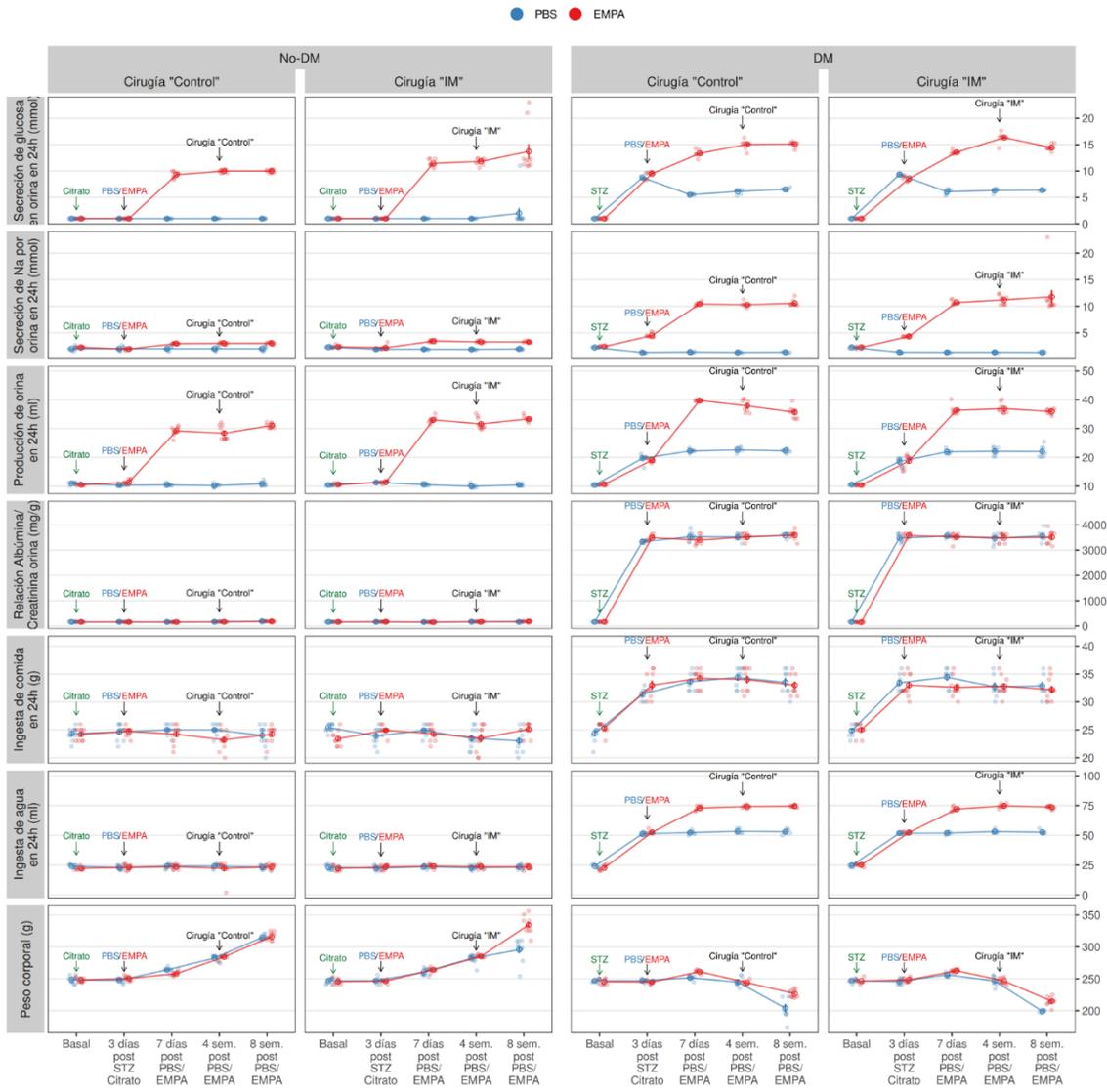
**Figura 19:** La empagliflozina modula la actividad NOS y el GCH1 cardíaco. (a, b) Análisis representativo de transferencia Western de nNOS y activación de eNOS. (c) Niveles NO. (d) Niveles O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (e) Niveles de nitrotirosina. (f) Imágenes de microscopía confocal después del análisis de inmunofluorescencia realizado con cardiomiocitos que expresan tubulina (verde). (g) Modelo de acción de empagliflozina en el miocardio. Todas las cuantificaciones derivan de seis experimentos independientes/grupo. Los resultados se muestran como diagramas de dispersión y se resumen con diagramas de caja. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



**Figura 20: Efectos de EMPA en parámetros plasmáticos en DM y no DM**



**Figura 21: Efectos EMPA en parámetros urinarios e ingesta.**



# 17. ANEXOS



**Tabla anexo 1:** Medidas ecocardiográficas de ratas con infarto y control y EMPA diabéticas y no diabéticas a las 4 semanas post IM.

FE: fracción de eyección; FC, frecuencia cardíaca, LPM: latidos por minuto; VI, ventrículo izquierdo; LVEDV, volumen ventricular izquierdo al final de la diástole; LVESV, volumen ventricular izquierdo al final de la sístole; LVEDD, dimensiones ventriculares al final de la diástole; LVESD, dimensiones ventrículo izquierdo al final de la sístole; SF, cambio fraccional de área (VD); SV: volumen infarto; g: gramos; ml: mililitros; mm: milímetros. Los datos se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . †  $p < 0.01$ ; el valor de la p compara la diferencia media entre los grupos MI+EMPA y MI+PBS por cada parámetro ecocardiográfico.

	No-Dm				Dm			
	Control+ PBS	Control+ EMPA	IM+ PBS	IM+ EMPA	Control+ PBS	Control+ EMPA	IM+ PBS	IM+ EMPA
N.º. Animales	10	10	10	10	8	9	7	10
Peso, g	314.9± 1.09	316.4± 1.89	295.5± 5.51	334.4± 4.3	204± 6.68	340.67± 5.77†	199.14± 0.7	343.7± 7.25†
FC, lpm	251.2± 2.81	250.6± 3.13	216.2± 2.64	227± 3.02	252.75± 5.87	236.11± 6.41	212.71± 4.22	245.5± 4.23
LVEDV, ml	0.35± 0.01	0.39± 0.01	0.46± 0.01	0.50± 0.02†	0.3± 0.02	0.36± 0.01	0.67± 0.02	0.45± 0.02†
LVESV, ml	0.16± 0.01	0.16± 0.01	0.33± 0.01	0.31 ±0.01	0.18± 0.01	0.19± 0.01	0.53± 0.01	0.31± 0.01†
SV, ml	0.46± 0.03	0.45± 0.04	0.30± 0.02	0.44± 0.01	0.54± 0.03	0.52± 0.01	0.39± 0.05	0.49± 0.06
LVEDD mm	7.75± 0.19	7.77± 0.22	10.31± 0.12	9.24± 0.16†	7.77± 0.13	8.13± 0.04	10.0± 0.2	8.91± 0.22†
LVESD mm	4.28± 0.12	4.21± 0.14	7.59± 0.11	6.00± 0.09†	4.39± 0.08	4.40± 0.08	7.50± 0.25	5.64± 0.22†
SF (%)	44.66± 1.67	45.91± 0.73	26.41± 0.53	34.94± 1.31†	43.49± 0.68	45.87± 1.05	24.81± 2.67	36.77± 1.44†
FE (%)	54.08± 2.02	57.73± 2.13	29.4± 1.46	39.48± 1.02†	40.15± 2.32	46.66± 1.88	21.37± 1.9	31.49± 1.47†

**Tabla anexo 2:** Resultados respecto a la figura 12: EF, fracción de eyección; HW, peso miocárdico; MI infarto miocardio; TL, tibia; FS, cambio fraccional de área.

		NoEMPA	EMPA	Diferencia	PP	PN	
<b>HW/TL (mg/mm)</b>	No-Dm	Control	4.69 [3.84, 5.57]	5.03 [4.18,5.88]	0.34 [-0.91,1.51]	0.718	0.282
		IM	11.33 [10.48, 12.18]	6.77 [5.93, 7.64]	4.56 [-5.74, -3.34]	<0.001	>0.999
	Dm	Control	10.06 [9.07, 11.02]	6.76 [5.85, 7.66]	-3.3 [-4.56,-1.93]	<0.001	>0.999
		MI	15.36 [14.33,16.37]	5.65 [4.81,6.48]	-9.71 [-11.02,-8.37]	<0.001	>0.999
<b>FS (%)</b>	No-Dm	Control	44.56 [42.09,47.16]	45.91 [43.27,48.34]	1.35 [-2.18,4.83]	0.771	0.229
		IM	26.5 [23.89, 28.99]	34.96 [32.46, 37.49]	8.46 [5.01, 11.94]	>0.999	<0.001
	Dm	Control	43.52 [40.7,46.38]	45.87 [43.07,48.57]	2.35 [-1.56, 6.33]	0.883	0.117
		IM	24.81 [21.8,27.78]	36.79 [34.19, 39.41]	11.98 [7.98, 15.9]	>0.999	<0.001
<b>EF (%)</b>	No-Dm	Control	54.03 [50.62, 57.47]	57.66 [54.15,61.15]	3.63 [-1.09, 8.58]	0.928	0.072
		IM	29.4 [26.06, 32.78]	39.5 [36,42.91]	10.1 [1.14, 11.81]	>0.990	0.010
	Dm	Control	40.19 [36.56,44.01]	46.67 [43.11,50.15]	6.48 [1.46, 11.45]	0.991	0.009
		IM	21.29 [17.32, 25.37]	31.47 [28, 34.87]	10.17 [4.92, 15.65]	>0.999	<0.001
<b>Tamaño IM (%)</b>	No-Dm	Control	----	----	----	----	----
		IM	39.87 [38.19,41.56]	25.06 [23.44, 26.68]	-14.81 [-17.11,-12.49]	<0.001	>0.999
	Dm	Control	----	----	----	----	----
		IM	37.69 [35.68, 39.69]	21.52 [19.78,23.27]	-16.17 [-18.89,-13.58]	<0.001	>0.999

**Tabla anexo 3:** Mediciones de ecocardiografía de control de infarto simulado y MI y ratas no diabéticas y diabéticas tratadas con EMPA a las 4 semanas después del IM.

		No EMPA		EMPA		Difference		PP		PN I	
Nº de animales	No-Dm	Control	10	10	----	----	----	----	----	----	----
		IM	10	10	----	----	----	----	----	----	----
	Dm	Control	8	9	----	----	----	----	----	----	----
		IM	7	10	----	----	----	----	----	----	----
Peso, g	No-Dm	Control	314.32 [305.13, 323.86]	316.66 [307.26, 326.05]	2.34 [-10.45, 15.39]	0.642	0.358				
		IM	295.66 [286.67, 304.94]	334.21 [324.61, 343.62]	38.55 [25.28, 51.78]	>0.999	<0.001				
	Dm	Control	204.56 [193.96, 215.48]	340.4 [330.97, 350.07]	135.84 [121.45, 150.21]	>0.999	<0.001				
		IM	199.09 [188.11, 210.5]	343.7 [333.81, 353.36]	144.61 [129.86, 159.85]	>0.999	<0.001				
HR, bpm	No-Dm	Control	251.25 [243.61, 259.24]	250.35 [242.56, 258.34]	-0.91 [-12.27, 10.14]	0.439	0.561				
		IM	216.18 [208.61, 223.96]	227.1 [219.33, 234.89]	10.91 [0.15, 21.62]	0.976	0.024				
	Dm	Control	252.28 [243.67, 260.88]	236.5 [228.05, 244.71]	-15.79 [-27.66, -4.09]	0.005	0.995				
		IM	213.11 [204, 222.47]	245.14 [237.1, 252.89]	32.03 [19.97, 43.48]	>0.999	<0.001				
LVEDV (ml)	No-Dm	Control	0.35 [0.33, 0.38]	0.39 [0.37, 0.42]	0.04 [0, 0.08]	0.963	0.017				
		IM	0.46 [0.43, 0.49]	0.5 [0.48, 0.53]	0.04 [-0.03, 0.1]	>0.999	<0.001				
	Dm	Control	0.3 [0.27, 0.33]	0.36 [0.33, 0.39]	0.06 [0.02, 0.1]	0.997	0.003				
		IM	0.67 [0.64, 0.7]	0.45 [0.42, 0.47]	-0.22 [-0.26, -0.18]	<0.001	>0.999				
LVESV (ml)	No-Dm	Control	0.16 [0.14, 0.18]	0.16 [0.15, 0.18]	0 [-0.02, 0.03]	0.581	0.419				
		IM	0.33 [0.31, 0.35]	0.31 [0.29, 0.32]	-0.02 [-0.05, 0]	0.029	0.971				
	Dm	Control	0.18 [0.16, 0.2]	0.19 [0.17, 0.21]	0.01 [-0.02, 0.04]	0.792	0.208				
		IM	0.53 [0.51, 0.55]	0.31 [0.29, 0.32]	-0.22 [-0.25, -0.19]	<0.001	>0.999				
LVEDD; (mm)	No-Dm	Control	7.77 [7.44, 8.11]	7.77 [7.44, 8.09]	0 [-0.46, 0.47]	0.500	0.500				
		IM	10.3 [9.96, 10.63]	9.25 [8.92, 9.59]	-1.05 [-1.5, -0.57]	<0.001	>0.999				
	Dm	Control	7.78 [7.41, 8.14]	8.13 [7.76, 8.48]	0.35 [-0.16, 0.85]	0.910	0.090				
		IM	10 [9.61, 10.39]	8.91 [8.58, 9.24]	-1.09 [-1.62, -0.59]	<0.001	>0.999				
LVESD (mm)	No-Dm	Control	4.29 [4.02, 4.57]	4.21 [3.94, 4.48]	-0.08 [-0.47, 0.3]	0.342	0.658				
		IM	7.58 [7.28, 7.85]	6 [5.73, 6.28]	-1.57 [-1.96, -1.17]	<0.001	>0.999				
	Dm	Control	4.39 [4.07, 4.69]	4.4 [4.11, 4.68]	0.01 [-0.42, 0.43]	0.524	0.476				
		IM	7.5 [7.18, 7.83]	5.64 [5.36, 5.93]	-1.86 [-2.28, -1.43]	<0.001	>0.999				
FS (%)	No-Dm	Control	44.56 [42.09, 47.16]	45.91 [43.27, 48.34]	1.35 [-2.18, 4.83]	0.771	0.229				
		IM	26.5 [23.89, 28.99]	34.96 [32.46, 37.49]	8.46 [5.01, 11.94]	>0.999	<0.001				
	Dm	Control	43.52 [40.7, 46.38]	45.87 [43.07, 48.57]	2.35 [-1.56, 6.33]	0.883	0.117				
		IM	24.81 [21.8, 27.78]	36.79 [34.19, 39.41]	11.98 [7.98, 15.9]	>0.999	<0.001				
EF (%)	No-Dm	Control	54.03 [50.62, 57.47]	57.66 [54.15, 61.15]	3.63 [-1.09, 8.58]	0.928	0.072				
		IM	29.4 [26.06, 32.78]	39.5 [36.42, 42.91]	10.1 [1.14, 11.81]	>0.990	0.010				
	Dm	Control	40.19 [36.56, 44.01]	46.67 [43.11, 50.15]	6.48 [1.46, 11.45]	0.991	0.009				
		IM	21.29 [17.32, 25.37]	31.47 [28, 34.87]	10.17 [4.92, 15.65]	>0.999	<0.001				

**Tabla anexo 4:** EMPA: empagliflozina; STZ: estreptozotocina. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. † p <0,01; el valor p compara las diferencias medias entre el grupo STZ/Citrato y su grupo basal, para cada parámetro; \* p <0.01, el valor p compara las diferencias de medias entre el grupo PBS/EMPA y su grupo basal, para cada parámetro.

Parámetros	Basal		3 días post-STZ/Citrato	7 días post-PBS/EMPA		4 semanas post-PBS/EMPA		8 semanas post-PBS/EMPA		
			-----	PBS	EMPA	PBS	EMPA	PBS	EMPA	
Glucosa (mmol/L)	10.04 $\pm$ 0.05	No-DM	10.01 $\pm$ 0.05	9.8 $\pm$ 0.08	10.03 $\pm$ 0.02	9.95 $\pm$ 0.07	9.92 $\pm$ 0.05	Control	10 $\pm$ 0.01	9.92 $\pm$ 0.08
		DM	16.61 $\pm$ 0.1+	17.02 $\pm$ 0.08	10.01 $\pm$ 0.09*	16.87 $\pm$ 0.614	10.09 $\pm$ 0.04*	IM	9.88 $\pm$ 0.08	9.71 $\pm$ 0.1
								Control	16.71 $\pm$ 0.14	10.07 $\pm$ 0.06*
		IM	17.11 $\pm$ 0.07	9.9 $\pm$ 0.06*						
Na <sup>+</sup> (g/dl)	112.8 $\pm$ 0.33	No-DM	105.1 $\pm$ 1.72	110.1 $\pm$ 1.85	114.4 $\pm$ 1.71	112.9 $\pm$ 2.23	116.7 $\pm$ 3.18	Control	115.9 $\pm$ 1	114.2 $\pm$ 1.44
		DM	52.44 $\pm$ 0.47	52.25 $\pm$ 0.53	72.89 $\pm$ 0.59*	53.38 $\pm$ 0.62	74.11 $\pm$ 0.39*	IM	114.2 $\pm$ 1.41	117.6 $\pm$ 1.02
								Control	189.75 $\pm$ 2.02	121 $\pm$ 0.99*
		IM	188.29 $\pm$ 2.02	118.2 $\pm$ 0.93*						
K <sup>+</sup> (g/dl)	10 $\pm$ 0.01	No-DM	9.96 $\pm$ 0.06	9.95 $\pm$ 0.08	10 $\pm$ 0.07	10.03 $\pm$ 0.05	10.13 $\pm$ 0.07	Control	10.07 $\pm$ 0.02	10.08 $\pm$ 0.07
		DM	6.35 $\pm$ 0.15+	6.25 $\pm$ 1.17	8.59 $\pm$ 0.11*	6.3 $\pm$ 0.06	8.9 $\pm$ 0.22*	IM	10.09 $\pm$ 0.04	10.29 $\pm$ 0.12
								Control	6.53 $\pm$ 0.25	9.25 $\pm$ 0.23*
		IM	6.08 $\pm$ 0.25	9.23 $\pm$ 0.17*						

**Tabla anexo 5:** EMPA: empagliflozina; STZ: estreptozotocina. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. † p <0,01; el valor p compara las diferencias medias entre el grupo STZ/Citrato y su grupo basal, para cada parámetro; \* p <0.01, el valor p compara las diferencias de medias entre el grupo PBS/EMPA y su grupo basal, para cada parámetro.

Parámetros	Basal		3 días post-STZ/Citrato	7 días post-PBS/EMPA		4 semanas post-PBS/EMPA		8 semanas post-PBS/EMPA		
			-----	PBS	EMPA	PBS	EMPA	PBS	EMPA	
Excreción de glucosa urinaria de 24h (mmol)	-----	No-DM	-----	---	9.32 $\pm$ 0.18	-----	10.01 $\pm$ 0.09	Control	-----	10.01 $\pm$ 0.09
		DM	9.49 $\pm$ 0.15+	5.53 $\pm$ 0.05	13.34 $\pm$ 0.2*	6.13 $\pm$ 0.14	15.05 $\pm$ 0.27*	IM	2 $\pm$ 1	13.71 $\pm$ 1.4*
								Control	6.53 $\pm$ 0.08	15.11 $\pm$ 0.16*
		IM	6.38 $\pm$ 0.05	14.45 $\pm$ 0.16*						
Excreción de Na <sup>+</sup> urinaria de 24h (mmol)	2.25 $\pm$ 0.02	No-DM	1.96 $\pm$ 0.04	2.02 $\pm$ 0.11	2.98 $\pm$ 0.03	2.02 $\pm$ 0.11	3.03 $\pm$ 0.06*	Control	2.02 $\pm$ 0.11	3.03 $\pm$ 0.06*
		DM	1.32 $\pm$ 0.13+	1.32 $\pm$ 0.09	10.43 $\pm$ 0.1*	1.52 $\pm$ 0.14	10.3 $\pm$ 0.15*	IM	1.97 $\pm$ 0.04	3.29 $\pm$ 0.03*
								Control	1.36 $\pm$ 0.06	1057 $\pm$ 0.2*
		IM	1.25 $\pm$ 0.16	11.79 $\pm$ 1.25*						
Excreción de urinaria de 24h (ml)	10.49 $\pm$ 0.1	No-DM	11.33 $\pm$ 0.27	10.46 $\pm$ 0.12	29.18 $\pm$ 0.46*	10.23 $\pm$ 0.18	28.37 $\pm$ 0.79*	Control	10.81 $\pm$ 0.23	31.06 $\pm$ 0.26*
		DM	19.02 $\pm$ 0.22+	22.2 $\pm$ 0.19	39.71 $\pm$ 0.08*	22.58 $\pm$ 0.29	37.86 $\pm$ 0.69*	IM	10.42 $\pm$ 0.12	33.35 $\pm$ 0.28*
								Control	22.25 $\pm$ 0.21	35.62 $\pm$ 0.67*
		IM	22.01 $\pm$ 0.76	35.9 $\pm$ 0.27*						
Cociente Alb/Cr (mg/g)	160.4 $\pm$ 2.2	No-DM	158.2 $\pm$ 1.94	155.8 $\pm$ 3.14	155.2 $\pm$ 2.77	164.5 $\pm$ 2.14	164.5 $\pm$ 4.47	Control	185.1 $\pm$ 0.31	179.6 $\pm$ 2.25
		DM	3492 $\pm$ 35.91+	3532 $\pm$ 64.69	3399 $\pm$ 60.74	3517 $\pm$ 47.21	3522 $\pm$ 43.11	IM	160.8 $\pm$ 3.03	176.9 $\pm$ 5.03
								Control	3584 $\pm$ 31.0	3591 $\pm$ 54.77
		IM	3565 $\pm$ 83.66	3506 $\pm$ 81.58						

**Tabla anexo 6:** EMPA: empagliflozina; STZ: estreptozotocina. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. † p <0,01; el valor p compara las diferencias medias entre el grupo STZ/Citrato y su grupo basal, para cada parámetro; \* p <0.01, el valor p compara las diferencias de medias entre el grupo PBS/EMPA y su grupo basal, para cada parámetro.

Parámetros	Basal		3 días post-STZ/Citrato	7 días post-PBS/EMPA		4 semanas post-PBS/EMPA		8 semanas post-PBS/EMPA								
				PBS	EMPA	PBS	EMPA	PBS	EMPA							
Ingesta comida 24h (g)	24.2 $\pm$ 0.36	No-DM	24.7 $\pm$ 0.26	24 $\pm$ 0.3	24.2 $\pm$ 0.53	25 $\pm$ 0.3	23.2 $\pm$ 0.59	Control	24 $\pm$ 0.61	24.2 $\pm$ 0.47						
			IM	23 $\pm$ 0.63	25.1 $\pm$ 0.38	DM	33 $\pm$ 0.83	33.62 $\pm$ 0.56	34.22 $\pm$ 0.57	34.38 $\pm$ 0.62	34 $\pm$ 0.73	Control	33.5 $\pm$ 0.8	33 $\pm$ 0.62		
		IM	32.86 $\pm$ 0.77	32.2 $\pm$ 0.68	Control		23.2 $\pm$ 0.53	23.5 $\pm$ 0.64	DM	52.44 $\pm$ 0.47	52.25 $\pm$ 0.53	72.89 $\pm$ 0.59*	53.38 $\pm$ 0.62	74.11 $\pm$ 0.39*	Control	53 $\pm$ 0.68
		IM	52.57 $\pm$ 0.61	73.6 $\pm$ 0.4*	No-DM	250.6 $\pm$ 1.07	264 $\pm$ 1.09	258.1 $\pm$ 0.99	282.4 $\pm$ 1.32	284.3 $\pm$ 1.04	Control	314.9 $\pm$ 1.09	316.4 $\pm$ 1.89			
Ingesta agua 24h (g)	22.2 $\pm$ 0.42	No-DM	22.1 $\pm$ 0.74	24.1 $\pm$ 0.55	23.5 $\pm$ 0.62	24.1 $\pm$ 0.55	22.2 $\pm$ 0.28	Control	295.5 $\pm$ 5.51	334.4 $\pm$ 4.3						
			IM	23.4 $\pm$ 0.56	23.3 $\pm$ 0.54	DM	245.11 $\pm$ 0.89	251.62 $\pm$ 1.12	261.22 $\pm$ 0.83	245 $\pm$ 2.46	254.44 $\pm$ 0.5	Control	204 $\pm$ 6.68	210 $\pm$ 1.77		
		Control	53 $\pm$ 0.68	74.44 $\pm$ 0.29*	No-DM	250.6 $\pm$ 1.07	264 $\pm$ 1.09	258.1 $\pm$ 0.99	282.4 $\pm$ 1.32	284.3 $\pm$ 1.04	Control	199.14 $\pm$ 0.7	211 $\pm$ 2.01			
		IM	52.57 $\pm$ 0.61	73.6 $\pm$ 0.4*	DM	245.11 $\pm$ 0.89	251.62 $\pm$ 1.12	261.22 $\pm$ 0.83	245 $\pm$ 2.46	254.44 $\pm$ 0.5	IM	199.14 $\pm$ 0.7	211 $\pm$ 2.01			
Peso corporal (g)	248.2.2 $\pm$ 1.04	No-DM	250.6 $\pm$ 1.07	264 $\pm$ 1.09	258.1 $\pm$ 0.99	282.4 $\pm$ 1.32	284.3 $\pm$ 1.04	Control	204 $\pm$ 6.68	210 $\pm$ 1.77						
			IM	295.5 $\pm$ 5.51	334.4 $\pm$ 4.3	DM	245.11 $\pm$ 0.89	251.62 $\pm$ 1.12	261.22 $\pm$ 0.83	245 $\pm$ 2.46	254.44 $\pm$ 0.5	IM	199.14 $\pm$ 0.7	211 $\pm$ 2.01		
		Control	314.9 $\pm$ 1.09	316.4 $\pm$ 1.89	No-DM	250.6 $\pm$ 1.07	264 $\pm$ 1.09	258.1 $\pm$ 0.99	282.4 $\pm$ 1.32	284.3 $\pm$ 1.04	Control	199.14 $\pm$ 0.7	211 $\pm$ 2.01			
		IM	295.5 $\pm$ 5.51	334.4 $\pm$ 4.3	DM	245.11 $\pm$ 0.89	251.62 $\pm$ 1.12	261.22 $\pm$ 0.83	245 $\pm$ 2.46	254.44 $\pm$ 0.5	IM	199.14 $\pm$ 0.7	211 $\pm$ 2.01			